

CARTAS AL COMITE DE REDACCION

Reacción de polimerasa en cadena: detección y caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi* en niños chagásicos

A través de un estudio de niños hospitalizados por diversas patologías en el hospital Materno Infantil Germán Urquidí de la ciudad de Cochabamba, zona altamente endémica para la enfermedad de Chagas⁴, se efectuó una detección sistemática de la infección por *Trypanosoma cruzi*, comparando los tests de diagnóstico clásicos (parasitológicos y serológicos) con la técnica de polimerización en cadena (PCR).

Así, con sondas de DNA, se detectó la presencia de cepas de *T. cruzi*, correspondientes a dos clones mayores circulando en Bolivia en el ciclo doméstico y se evaluó el número de infecciones dobles.

Al mismo tiempo, se obtuvieron los datos clínicos de cada uno de los pacientes en estudio para correlacionarlos con la infección por *T. cruzi*.

El estudio incluyó 31 niños, los que según los exámenes clásicos de detección fueron divididos en 3 grupos. El primero estuvo constituido por 12 niños que presentaban una parasitemia positiva, puesta en evidencia mediante la búsqueda de parásitos móviles observados en la interfase de al menos uno de cuatro tubos capilares heparinizados y centrifugados a 9000 rpm durante 5 minutos; en 8 de estos casos la parasitemia aparecía asociada a una serología específica anti-*T. cruzi* positiva (inmunofluorescencia y hemaglutinación indirecta). El segundo grupo estuvo constituido por 9 niños que presentaban una parasitemia negativa asociada a una serología anti-*T. cruzi* positiva y el tercero por 10 niños con parasitemia y serología negativas.

La técnica de PCR fue realizada en muestras de sangre (interfases correspondientes a 5 ml de sangre total) según una metodología previamente descrita², introduciéndose en cada protocolo los controles adecuados. Se utilizaron iniciadores que circundaban las partes hipervariables de los minicírculos del kDNA (HVRm) para amplificar estas secuencias de tamaño específico de *T. cruzi* (270 pb)⁶. Tras «southern blot» se procedió a la hibridación de los productos de amplificación con dos sondas de kDNA. Estas sondas fueron elaboradas a partir de la HVRm de dos cepas de referencia correspondientes a dos clones mayores circulantes en Bolivia, numerados 20 y

39^{5, 6}, estas sondas son además específicas de cada clon y no generan ninguna reacción cruzada entre ellas. Se realizó la hibridación con marcado no radioactivo, utilizándose el ECL como sistema de detección de genes¹. El conjunto de los resultados aparece en la tabla 1.

Según se resume en la tabla 1, el grupo 1, constituido por 12 pacientes en la fase aguda de la enfermedad, presentaba 83% de positividad en PCR; en el grupo 2, para el cual los tests parasitológicos de los 9 pacientes eran negativos, se detectó 63% de positividad en PCR; dos casos del tercer grupo presentaron un test PCR positivo, pudiendo corresponder a pacientes en fase inicial de la infección, en la que la parasitemia es todavía escasa y la respuesta inmune (IgG) todavía no se ha desarrollado.

Estos resultados demuestran una mayor sensibilidad de la PCR como examen parasitológico de la enfermedad de Chagas. Aproximadamente 60% de los pacientes estudiados fueron positivos por PCR mientras que el examen directo de la interfase de los tubos capilares reveló solamente 32% de positividad. En cambio, la búsqueda de parásitos circulantes por medio de observación microscópica directa resultó poco sensible, ya que los casos positivos evidenciaron generalmente muy pocos parásitos, además de requerir un observador muy experimentado.

Al analizar las causas clínicas de admisión de los pacientes no se observó ninguna diferencia significativa entre el número de pacientes hospitalizados por diarrea, deshidratación y desnutrición entre los tres grupos. El análisis clínico detectó un síndrome digestivo en 64,5% de los pacientes, un síndrome pulmonar en 22,6%, 2 casos de tuberculosis, 2 casos de meningitis y 4 casos diversos. Ninguno de estos síndromes fue más frecuente en un grupo particular. Por otro lado, ningún diagnóstico clínico de internación permitió sospechar una infección chagásica en estos pacientes.

La metodología de PCR presentada en este trabajo permite, gracias a la especificidad de las HVRm para cada clon o grupo de clones genéticamente relacionados, caracterizar directamente en la sangre las cepas circulantes. Este método evita las etapas de aislamiento y cultivo masivo de cepas que dan lugar a selección de cepas en caso de infecciones mixtas³. Los resultados confirman la alta frecuencia de los clones 20

TABLA 1.— Presencia de los clones 20 y 39* de *Trypanosoma cruzi* en niños chagásicos

Grupos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Total
N° de niños	12	9	10	31
Edad media (meses)	14,3 ± 7,8	28,2 ± 21,0	15 ± 17,0	18,2 ± 16,7
Parasitemia (%)	100	0	0	
Anticuerpos (%)	66,6	100	0	
PCR positiva (%)	83,3	66,6	20,0	58,0
clones de <i>T. cruzi</i>				
clon 20	3	0	0	3
clon 39	3	2	2	7
clones 20 + 39	1	3	0	4
otro clon**	1	0	0	1

* ver clasificación según Tibayrenc y Ayala

** la ausencia de reconocimiento de los productos de amplificación por las sondas específicas de los clones 20 y 39 marca la presencia de un otro clon de *T. cruzi*.

y 39 en Bolivia. Para un solo paciente, los productos de amplificación (270 pb) no fueron hibridados por una de las dos sondas 20 y 39; este paciente podría ser infectado por una cepa de *T. cruzi* no perteneciente al clon 20 ni al clon 39. Observamos casos de infecciones mixtas por el reconocimiento de los productos de amplificación por las dos sondas. El porcentaje de infecciones mixtas parece significativamente más importante en el grupo 2 (3/5 casos) que en los pacientes en fase inicial de la enfermedad que incluye todos los pacientes del grupo 1 y los dos pacientes del grupo 3 con PCR positiva (1/10 casos), ($\chi^2 = 4,24$ $p < 0,05$). Esta diferencia de tasas de infecciones mixtas podría ser explicada por reinfecciones; si así fuera, se admitiría una ausencia de premunición a la reinfección.

Resultados de estudios anteriores realizados en 9 localidades del departamento de Cochabamba nos permitieron observar un promedio de 52,3% de infecciones dobles con los clones 20 y 39 en el vector doméstico (*Triatoma infestans*); en ninguna localidad fue encontrado un porcentaje inferior a 28,6% (comunicación personal por S.F. Brenière y M.F. Bosseno). El 10% de infecciones dobles encontrados en este trabajo en los pacientes en fase inicial (grupo 1 y los dos casos del grupo 3), sería más bajo de lo esperado en caso de transmisión de los parásitos en ausencia de selección. Este resultado dejar suponer que (i) solamente un número sumamente re-

ducido de parásitos podría iniciar una infección o (ii) que tendría lugar una selección de clones de *T. cruzi*.

La metodología presentada en este trabajo para la caracterización directa de cepas de *T. cruzi* en los huéspedes abre hipótesis de trabajo en cuanto a la transmisión de este parásito y merece una ampliación con mayor muestreo. Por otro lado, la introducción del nuevo método de PCR, muy sensible para la detección de los parásitos en niños, podría en consecuencia ayudar a estudios pre y post tratamiento.

Marie F. Bosseno, Faustino Torrico, Jenny Telleria, François Noireau, Simone F. Brenière

ORSTOM, Institut Français de Recherche pour le Développement en Coopération, CP 9214, La Paz, Bolivia

- Brenière SF, Bosseno MF, Barnabé C, Urdaneta Morales S, Tibayrenc M. Copy number differences in the 195 bp repeated satellite DNA from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: potential use for epidemiologic survey. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1993; 88: 163-5.
- Brenière SF, Bosseno MF, Revollo S, Rivera MT, Carlier Y, Tibayrenc M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 36: 335-41.
- Miles MA, Cibulskis RE. Zymodeme characterization

of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 1986; 2: 94-8.

4. Pless M, Juranek D, Kosarsky P, Steurev F, Tapia G, Bermúdez H. The epidemiology of chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis and domiciliary triatomine distribution. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 47: 539-46.
5. Tibayrenc M, Ayala FJ. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 1988; 42: 277-92.
6. Veas F, Brenière SF, Cuny G, Brengues C, Solari A, Tibayrenc M. General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by Polymerase Chain Reaction. *Cell Mol Biol* 1991; 37: 73-84.