

Utilidad de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

Brusés, Bettina L. - Lucero, Horacio - Gorodner, Jorge O.

Departamento de Biología Molecular - Instituto de Medicina Regional - UNNE.
Av. Las Heras 727 - (3500) Resistencia - Chaco - Argentina.
Teléfono/Fax: +54 (3722) 428213 / 422793
E-mail: rhlucero@bib.unne.edu.ar

ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una parasitosis hística y hemática, endémica en vastas regiones de América Latina cuyo agente etiológico es el *Trypanosoma* (subgénero *Schisotrypanum*) *cruzi*, familia Trypanosomatidae, clase Zoomastigophora.

Este protozoo es transmitido por insectos hemípteros hematófagos, de la familia Reduviidae y de la subfamilia Triatominae, siendo *Triatoma infestans* el vector más frecuente en el ciclo nosogénico de la Argentina, adaptada ecológicamente a la vivienda humana.

La infección humana por *T. cruzi* puede presentarse de diferentes formas según las circunstancias y situaciones. La interacción parásito-hospedero es bastante dinámica en el caso de la enfermedad de Chagas humana, y está relacionada a múltiples factores y condicionantes ligados al tripanosoma (cepa, virulencia, inoculación), al hombre (edad, sexo, intercurrencias) y al medio ambiente.

En la infección humana se reconocen tres fases: una fase corta, aguda; un período largo asintomático, llamada fase indeterminada; y una fase larga crónica con manifestaciones clínicas.

Referente al diagnóstico de laboratorio, se basa en aquellos procedimientos que ponen en evidencia el parásito (los tripomastigotes en sangre periférica), o en aquellos que permiten detectar anticuerpos específicos. Si bien la demostración de la presencia del parásito es el diagnóstico de certeza, sólo es posible practicarlo con mayor éxito en la etapa aguda de la enfermedad, cuando la concentración de anticuerpos es baja.

Los métodos de detección del parásito se discriminan en métodos directos y métodos indirectos.

La PCR, con gran sensibilidad, se empleó con éxito en la detección e identificación del *T. cruzi*, en heces de triatomíneos y en sangre total o suero de pacientes chagásicos.

La elevada sensibilidad y especificidad de la PCR para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, que varía entre el 96 al 100%, la convierte en una excelente técnica para el seguimiento quimioterapéutico del tratamiento en pacientes con enfermedad aguda.

De acuerdo a los resultados publicados anteriormente, se llegó a la conclusión que la sensibilidad de la PCR supera ampliamente a la de las técnicas convencionales directas que poseen baja sensibilidad en pacientes o animales experimentales que padecen una infección crónica en la cual el número de parásitos circulantes es muy reducido para detectarlos por técnicas parasitológicas.

De ahí la importancia radical que hoy reviste la utilización de la técnica de PCR, constituyendo un diagnóstico de certeza de la infección, al demostrar la presencia del parásito.

El propósito de este trabajo es, por lo tanto, comparar los distintos resultados obtenidos por las diferentes técnicas de serología en relación a la técnica de PCR, en dos grupos de pacientes divididos de acuerdo a infección crónica o aguda

MATERIALES Y METODOS

La selección de los pacientes se realizó teniendo en cuenta resultados anteriores de serología, los que fueron proporcionados por el Laboratorio Central de Salud Pública y por el Instituto de Medicina Regional, ambos de la ciudad de Resistencia, y por el Instituto de Cardiología de la ciudad de Corrientes.

✂ Evaluación serológica:

Para la evaluación serológica se consideraron positivos aquellos pacientes cuyos sueros presentaron títulos $\geq 1/32$ en las pruebas de Hemaglutinación Indirecta e Inmunofluorescencia Indirecta, siguiendo las normas de la OMS.

✧ Extracción de DNA de sangre periférica con Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB):

Se partió de 700 μ l. de sangre entera, anticoagulada con EDTA 1%. Se eliminaron los glóbulos rojos mediante 4 lavados con igual volumen de un buffer de lisis de glóbulos rojos (10 mM Tris-HCl pH 7.6; 5 mM MgCl₂; 10 mM NaCl). Luego se incubó a 60°C durante 1 hora aproximadamente, con una solución de homogeneización (2% (p/v) de CTAB; 1,4 M de NaCl; 0,2% (p/v) β -mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 7.5). Posteriormente, se procedió a la extracción de proteínas con un volumen de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Con posterioridad a la centrifugación, la solución quedó dividida en 3 fases: una fase superior o acuosa, donde están en solución, los ácidos nucleicos; una fase intermedia o interfase, que contiene las proteínas; y una fase inferior, en la que se concentran los lípidos. La fase superior debió ser transvasada con cuidado a otro tubo Eppendorf. Luego se precipitó esta fase acuosa con un volumen de alcohol isopropílico (si existe buena cantidad de DNA, éste es visible en esta etapa). Finalizada la centrifugación, se descartó el sobrenadante, y se agregó 1 ml. de etanol 70%. Se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante, y después que el tubo se secó, se resuspendió el DNA obtenido en buffer TE o agua destilada estéril.

✧ Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):

Esta técnica incluye principalmente los pasos que se detallan a continuación:

Se preparó una solución madre de un volumen final de 50 μ l, conteniendo agua destilada estéril; buffer 10X; Cl₂Mg 50 mM; 100 mM de dNTP's; 25 mM de cada uno de los primers: #121 y #122; Taq Polimerasa y 5 μ l de la muestra de DNA. Esta solución fue colocada en un tubo de PCR de 0,2 ml.

Se comenzó luego el proceso de amplificación, colocando el tubo Eppendorf en el termociclador PTC-100 MJ Research, Inc., y se siguieron las siguientes condiciones de ciclado: 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 60°C; 1 minuto a 72°C; 33 ciclos de: 40 segundos a 94°C, 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C, correspondientes a la desnaturalización, hibridización y extensión de los primers respectivamente; y por último, 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

Para la siembra y corrida electroforética se preparó un gel de agarosa al 2% y se lo colocó en una cuba electroforética; se sembraron 9 μ l. del producto amplificado, y 1 μ l de buffer de corrida. Se conectó la cuba a una fuente de poder, y se corrió a 70 V. durante 45 minutos aproximadamente, tiempo y voltaje necesarios para poder observar la banda de 330 pares de bases correspondiente al DNA kinetoplastídico.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se tiñó el gel con bromuro de etidio y a continuación se lo colocó en el transiluminador UV para la visualización de las bandas específicas.

DISCUSION DE RESULTADOS

Tabla comparativa de los diferentes métodos de extracción de DNA

MÉTODO	μ g DNA/ml.	INDICE Abs 280/260
COMERCIAL INSTAGENE MATRIX	34,4 \pm 9,10	0,84 \pm 0,450
SALTING OUT	50,22 \pm 7,88	1,532 \pm 0,207
CTAB	178,85 \pm 14,03	1,897 \pm 0,029

Tablas de resultados de PCR según el estadio de la enfermedad

Se presentan un total de 17 pacientes, los cuales fueron discriminados en agudos y crónicos de acuerdo a la edad del paciente, títulos de anticuerpos y período transcurrido desde la primoinfección.

Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

<i>Pacientes Agudos</i>				<i>Pacientes Crónicos</i>			
PCR	+	-	Total	PCR	+	-	Total
Con tratamiento	0	4	4	Sin tratamiento	2	2	4
Sin tratamiento	7	2	9	Total	2	2	4
total	7	6	13				

Como se puede observar en la tabla superior, el 100% de los pacientes agudos que han recibido tratamiento, dieron un resultado negativo (-) para la PCR. Del total de pacientes agudos que no han recibido ningún tipo de tratamiento, el 80% dieron un resultado positivo (+) para la técnica de PCR, y el 20% restante fueron negativos (-) para esta reacción.

Se presentan cuatro (4) pacientes con infección crónica para la enfermedad, de los cuales el 50% arrojaron resultados negativos (-) para la PCR, y el 50% restante fueron positivos (+) para la misma reacción.

CONCLUSIONES

De acuerdo a las medidas espectrofotométricas, se pudo constatar que mediante la utilización del método de CTAB, se obtiene un DNA mucho más puro (medido por la relación del Índice de Absorbancia 280/260), y la cantidad total de DNA extraído es mayor en relación al de los otros dos métodos empleados (Salting Out y Método Comercial InstaGene Matrix).

Ninguno de los pacientes con infección aguda y que fueron tratados dieron un resultado positivo (+) para la PCR, es de suponer que todos los individuos han negativizado la reacción, pero para esto se necesitaría realizar el estudio por PCR antes y después del tratamiento.

Todos los pacientes que presentan infección aguda y fueron tratados, dieron un resultado para la PCR negativo (-), independientemente de los valores de serología (esto depende del lugar en la curva de descenso se encuentre). Sería conveniente seguirlos también con titulación de anticuerpos.

El mayor número de pacientes con resultados positivos (+) para la técnica de PCR, pertenecen a pacientes con infección aguda y que no fueron tratados. Se espera que, de recibir tratamiento negativizarán la PCR.

Aquellos casos en los que los pacientes presentan infección aguda y no tienen tratamiento, y además los resultados para la PCR dieron negativos (-), puede deberse al ciclo del parásito dentro del cuerpo del paciente, de acuerdo a períodos de “acantonamiento” en órganos y no en sangre periférica.

La técnica de PCR en los pacientes crónicos, es de resultado variable, y no determina fehacientemente el período evolutivo de la enfermedad, posiblemente por el mismo ciclo del parásito dentro del organismo.

Se necesitarían un mayor número de pacientes, tanto crónicos como agudos con y sin tratamiento como para poder corroborar los resultados obtenidos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Storino R, Auger S, Wojdyla D, Urrutia MI, Jörg M. Análisis descriptivo multivariado de la enfermedad de Chagas en 2260 pacientes. Rev Argen Cardiol 1998; 66: 17-39.
- Dias JCP. Enfermedad de Chagas. Epidemiología-clínica-terapéutica. Programa de salud humana, Bs. As. : 1984 : 106.
- WHO-World Health Organization. Control of Chagas disease. WHO technical report series 811. Geneva: 1991: 95.

- Wisnivesky C. Dinámica de la transmisión de la enfermedad de Chagas en la vivienda. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas Universidad de Buenos Aires 1982 ; 180.
- Cura E, de Tito E, Segura E. El diagnóstico y su control de calidad en la infección por *Trypanosoma cruzi*. En: Actualizaciones en la enfermedad de Chagas. Madoery R, Madoery C, Cámara MI. Editores, 1993: 125-132.
- Russomando G, Rojas de Arias A, Almirón M, Figueredo A, Ferreira ME, Morita K. *Trypanosoma cruzi*: Polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Experim Parasitol* 1996; 83: 62-66.
- Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *Journ of Clin Microbiol* 1992; 30: 2864-2868.
- Cerisola JA, Fatala-Chaben M, Lazzari JA. Test de hemaglutinación para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Prens Méd Argent* 1962; 49: 1761-1767.
- Alvarez M, Cerisola JA, Rohwedder RW. Test de inmunofluorescencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol Chilen Parasitol* 1968; 23: 4-9.
- Wincker P, Britto C, Borges-Pereira J y col. Use of simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural area. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51 (6): 771-777.