



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DOCTORADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“FRECUENCIA DE LA INFECCIÓN POR *Trypanosoma cruzi* EN
MUJERES EMBARAZADAS Y SUS RECIÉN NACIDOS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

GUILLERMINA CAMPOS VALDÉZ

CODIRECTORES:

DRA. ENEDINA JIMÉNEZ CARDOSO

DR. EDMUNDO BONILLA GONZÁLEZ

ASESOR:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA.

México, D.F. Noviembre del 2013

El Programa del Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001482, en el Nivel consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNNN0020. Número de la beca otorgada por CONACYT: 290505.

El proyecto recibió apoyo financiero por parte de la Organización Panamericana de la Salud con el número de acuerdo IKM/RC/RGP/MEX-3309 y el número de partida presupuestaria DCP NDR 124 PG 04-05 999.

Este trabajo fue realizado en los laboratorios de Expresión Génica de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y en el Laboratorio de Investigación en Parasitología del Hospital Infantil de México Federico Gómez.



Miembros del jurado de examen, designados por el Posgrado en Biología Experimental para la tesis “Frecuencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en mujeres embarazadas y sus recién nacidos” realizada por Guillermina Campos Valdéz, el día 28 de noviembre del 2013 en las instalaciones de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Profesor Titular “C” Tiempo completo
Biología de la Reproducción
Departamento de Ciencias Básicas y de la Salud
UAM Iztapalapa
pgdm@xanum.uam.mx

Dr. Humberto González Márquez

Profesor Titular “C” Tiempo completo
Laboratorio de Biología Celular
Departamento de Ciencias Básicas y de la Salud
UAM Iztapalapa
hgm@xanum.uam.mx

Dr. Benjamín Noguera Torres

Departamento de Parasitología
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN
bnoguera@hotmail.com

Dra. Carmen Guzmán Bracho

Directora de Diagnóstico y Referencia
INDRE
carmen.guzman@salud.gob.mx

Miembros del comité Tutorial de la tesis “Frecuencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en mujeres embarazadas y sus recién nacidos” realizada por Guillermina Campos Valdéz.

CODIRECTORA:

Dra. Enedina Jiménez Cardoso

Jefe del Laboratorio de Investigación en Parasitología. Hospital Infantil de México Federico Gómez. jimenezce@yahoo.com.mx

CODIRECTOR:

Dr. Edmundo Bonilla González

Profesor Titular “C” de tiempo completo. Laboratorio de Expresión Génica. Depto. Ciencias de la Salud. UAMI. mundo@xanum.uam.mx

ASESOR:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Biología de la Reproducción. Departamento de Ciencias Básicas y de la Salud UAMI. pgdm@xanum.uam.mx



FRECUENCIA DE LA INFECCION
POR *Trypanosoma cruzi* EN
MUJERES EMBARAZADAS Y SUS
RECIEN NACIDOS

En México, D.F., se presentaron a las 15:30 horas del día 28 del mes de noviembre del año 2013 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA
DRA. MARIA DEL CARMEN GUZMAN BRACHO
DRA. MARIA DEL PILAR CRISOSTOMO VAZQUEZ
DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:


DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: GUILLERMINA CAMPOS VALDEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



Guillermina Campos Valdez

GUILLERMINA CAMPOS VALDEZ
ALUMNA

REVISÓ

[Signature]

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

[Signature]

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTE

[Signature]

DR. PABLO GUSTAVO DAMIAN MATZUMURA

VOCAL

[Signature]

DRA. MARIA DEL CARMEN GUZMAN
BRACHO

VOCAL

[Signature]

DRA. MARIA DEL PILAR CRISOSTOMO
VAZQUEZ

SECRETARIO

[Signature]

DR. HUMBERTO GONZALEZ MARQUEZ

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por darme la oportunidad de realizar este trabajo.

A la Dra. Enedina Jiménez Cardoso por ser la persona que con gran paciencia me ha impulsado a continuar con mi formación profesional.

Al Dr. Edmundo Bonilla González por su apoyo, tiempo y conocimientos compartidos que me llevaron a concluir este trabajo.

Al Dr. Pablo Damián Matzumura por confiar en mí y darme el apoyo para ingresar al Doctorado, realizar el trabajo y la culminación de éste.

A los miembros del Jurado por el tiempo, paciencia, disposición y comentarios para la conclusión de este trabajo.

A las Doctoras Pilar Crisostomo, Leticia Eligio, Ma.de Lourdes Caballero y Luz Ofelia Franco, así como a todos mis compañeros del Laboratorio de Investigación en Parasitología.

A mis amigas Irene, Sandra, Sonia y Berenice.

Al Ing. Juan Campos Cortez, en donde se encuentre, gracias por confiar en mí.

A todos en BioAdvanced System en especial al Biol. Fernando Amilpa y a la Lic. Luz Campos.

A todas las personas que participaron en la realización de este trabajo.

RESUMEN

En México, la transmisión materno-fetal del parásito *Trypanosoma cruzi* ha sido poco estudiada. El primer caso se publicó en 1998 y a la fecha no hay más reportes. En este estudio se determinó la prevalencia de infección con *T. cruzi* en 1448 mujeres embarazadas de Oaxaca, Jalisco y el Distrito Federal, así como la frecuencia de transmisión a sus hijos recién nacidos y hasta los dos años de edad. La prevalencia se determinó por la serología reactiva a las pruebas de Chagas Stat-Pak y ELISA. La frecuencia de transmisión se determinó, primero, por la búsqueda del DNA de *T. cruzi* en sangre de cordón umbilical y dos años después por la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* propios del niño, mediante inmunodetección por ELISA, utilizando dos tipos de antígenos, uno total y otro recombinante. Se demostró que la prevalencia total de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas fue de 7.32% (106/1448) y por estados Jalisco fue el más alto (12.02%, 67/557), seguido de Oaxaca (4.4%, 35/794) y el Distrito Federal (4.12%, 4/97). El porcentaje de recién nacidos positivos a PCR en Oaxaca fue del 20% (7/35) y en Jalisco 11.94% (8/67), mientras que en el Distrito Federal, no se encontraron casos positivos. La frecuencia de transmisión hacia los niños evaluados tanto por PCR como por serología, se presenta de la siguiente manera: en Oaxaca fue de 9.09% (3/33) y en Jalisco de 3.07% (2/65). La frecuencia total fue de 4.9% (5/102), con lo cual los niños que resultaron positivos recibieron el tratamiento específico. La seroprevalencia materna fue más alta en el estado de Jalisco, pero la frecuencia de transmisión fue más alta en Oaxaca, estos resultados no presentan asociación con los datos ginecológicos de la madre y los datos antropométricos del recién nacido. Probablemente, los

resultados obtenidos se modificaron por la presencia de diferentes cepas del parásito presentes en las regiones estudiadas.

La alta frecuencia de la transmisión materno-fetal de *Trypanosoma cruzi* determinada en el presente trabajo, hace necesario diagnosticar la magnitud del problema a nivel nacional y establecer medidas de prevención y tratamiento.

ABSTRACT

In Mexico, the maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* has been little studied, the first case was published in 1998 and to date there are no more official reports. We determinate the *T. cruzi* infection prevalence in 1448 pregnant women from Oaxaca state, Jalisco state and Mexico City, as well as the frequency of transmission to their newborns after two years. The prevalence was obtained by the reactive serology to ELISA and Chagas Stat-Pak tests. The transmission frequency was determined first by the search of *T. cruzi* DNA in blood umbilical cord and second by the presence of specific anti-*T. cruzi* antibodies, by using two ELISA tests, one with total antigen and another with recombinant antigens. We found that the total prevalence of Chagas disease in pregnant women was 7.32% (106/1448), by states was 4.4% (35/794) in Oaxaca, 12.02% (67/557) in Jalisco and 4.12% (4/97), in Mexico City. The percentage of positive PCR newborns in Oaxaca was 20% (7/35) and in Jalisco was 11.94% (8/67); No positives were found in Mexico City. The transmission frequency in positive PCR children as evaluated by serology after two years was 9.09% (3/33) in Oaxaca and 3.07% (2/65) in Jalisco. The total transmission frequency was 4.9% (5/102); the positive children received the specific treatment. The maternal seroprevalence was highest in Jalisco state but the transmission frequency was highest in Oaxaca State, these results have not association with the mother gynecologic data and newborns anthropometric data. Probably, the results obtained are associated with the presence of different strains of the parasite present in the studied regions.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Definición de Enfermedad de Chagas	2
Epidemiología	2
Mecanismos de transmisión	5
Ciclo biológico.....	5
Vector	8
Manifestaciones clínicas	10
Fase aguda	10
Fase crónica.....	11
Diagnóstico	12
Diagnóstico en la fase aguda	12
Diagnóstico en la fase crónica	13
Tratamiento.....	13
ANTECEDENTES	15
Definición de Enfermedad de Chagas Congénita	16
Historia.....	¡Error! Marcador no definido.
Epidemiología	18
Evolución epidemilógica de la infección congénita con <i>T.cruzi</i>	22
Características de la infección	22
Respuesta inmune innata de la placenta	23
Patología e invasión de la placenta	24
Rutas de la transmisión materno-fetal de <i>T.cruzi</i>	26
Hematógena transplacentaria.....	26
Invasión de trofoblastos por el parásito	27
Invasión de la placenta a través de áreas carentes de trofoblastos	28
A traves de lesiones en la placenta	29
Migración de parásitos dentro del tejido coriónico	30
Otras rutas posibles para la transmisión.....	30
Regulación de la transmisión materno-fetal de <i>T.cruzi</i>	31
Factores involucrados en la transmisión de <i>T.cruzi</i> a recién nacidos	32
Genotipos de <i>T.cruzi</i>	33

Carga parasitaria materna	33
Inmunidad materna y otros factores involucrados en la infección congénita	34
Coinfección materna.....	36
Capacidad de la respuesta inmune del feto	36
Transmisión vertical de <i>T.cruzi</i> en otros mamíferos y en modelos experimentales	38
En mamíferos reservorios naturales de <i>T.cruzi</i>	38
Modelos experimentales de la transmisión congénita de <i>T.cruzi</i>	39
Ratón	39
Ratas	40
Manifestaciones clínicas y grado de mortalidad	41
Consecuencias a largo plazo de la infección congénita con <i>T.cruzi</i>	43
Diagnóstico de la infección congénita con <i>T.cruzi</i>	44
Detección de la infección en mujeres embarazadas.....	44
Detección de la infección fetal <i>in utero</i>	45
Detección de infección neonatal	45
Pruebas parasitológicas.....	45
Ensayo de PCR	46
Identificación de anticuerpos IgM e IgA específicos vs <i>T.cruzi</i>	47
Identificación de antígenos específicos	48
Identificación de antígenos solubles del parásito.....	49
Histopatología de la placenta.....	49
Identificación de la infección congénita con <i>T.cruzi</i> en niños.....	49
Recomendaciones de la OMS	50
Tratamiento de la infección congénita con <i>T.cruzi</i>	51
Prevención y control de la infección congénita con <i>T.cruzi</i>	52
FUNDAMENTO DE LAS METODOLOGIAS	53
Pruebas inmunológicas	54
Pruebas moleculares.....	58
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	63
HIPÓTESIS	66
OBJETIVOS	68

MATERIAL Y MÉTODOS	70
Población de estudio.....	71
Datos generales, clínicos y obstétricos de la madres y sus recién nacidos	71
Busqueda de mujeres embarazadas reactivas a <i>T.cruzi</i>	72
Presencia del DNA del parásito en sangre de cordón umbilical del recién nacido por PCR.....	73
Determinación de anticuerpos anti- <i>T.cruzi</i> en niños con PCR positiva después de dos años	75
Tratamiento	75
Análisis estadístico.....	75
RESULTADOS	76
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	106
BIBLIOGRAFÍA	108
ANEXOS	13030
Anexo 1. Medio LIT	131
Anexo 2. Reactivos	133
Anexo 3. Carta de consentimiento informado	140
ARTÍCULO	148

ÍNDICE DE TABLAS, GRÁFICAS Y FIGURAS

TABLAS	PÁGINA
Tabla 1. Cambios en parámetros epidemiológicos ocasionados por la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas, 1990-2000-2006.	4
Tabla 2. Distribución de las especies de Triatominos de mayor importancia medica en toda la República Mexicana.	9
Tabla 3. Principales reportes epidemiológicos en mujeres embarazadas y casos congénitos de infección con <i>T. cruzi</i> en países de América Latina.	20
Tabla 4. Estimaciones de la OMS sobre mujeres embarazadas y casos congénitos infectados con <i>T. cruzi</i> en países de América para el año 2005.	21
Tabla 5. Datos generales y obstétricos de las mujeres embarazadas positivas y negativas	78
Tabla 6. Análisis estadístico de los datos ginecológicos del total de las mujeres embarazadas.	79
Tabla 7. Datos antropométricos del total de los recién nacidos del estado de Oaxaca y Jalisco.	80
Tabla 8. Análisis estadístico de los datos antropométricos de recién nacidos con PCR positiva de Oaxaca y Jalisco.	81
Tabla 9. Seroprevalencia de infección por <i>T. cruzi</i> en mujeres embarazadas de los estados de Oaxaca, Jalisco y el D.F.	82
Tabla 10. Datos antropométricos de los recién nacidos positivos por PCR de Oaxaca y Jalisco.	87
Tabla 11. Serología por dos pruebas en mujeres embarazadas de Oaxaca y Jalisco.	88

Tabla 12. Serología por dos pruebas en niños positivos a PCR de más de 24 meses de edad de Oaxaca y Jalisco.	90
---	----

GRÁFICAS

PÁGINAS

Gráfica 1. Seroprevalencia materna, porcentaje de recién nacidos PCR positivos y frecuencia de transmisión de la infección por <i>T. cruzi</i> , en los estados de Oaxaca (A) y Jalisco (B).	91
---	----

FIGURAS

PÁGINAS

Figura 1. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> .	7
Figura 2. Rutas de la transmisión de <i>T. cruzi</i> a través de placenta.	27
Figura 3. Interpretación de los resultados de la Inmunocromatografía para la detección de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> en sangre, suero o plasma.	54
Figura 4. Método de ELISA para la identificación de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> en el suero de mujeres embarazadas.	56
Figura 5. Gráfica con los pasos de la PCR.	61
Figura 6. Distribución geográfica de las zonas de estudio.	77
Figura 7. Frecuencia del lugar de residencia en mujeres sero-reativas de Oaxaca.	83
Figura 8. Frecuencia del lugar de residencia en mujeres sero-reativas de Jalisco.	83
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación obtenidos en un gradiente de temperaturas con los iniciadores Tcz1/Tcz2.	84

Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación obtenidos con sangre infectada a diferentes diluciones usando los iniciadores Tcz1/Tcz2.	85
Figura 11. Amplificaciones del DNA extraído de sangre de cordón umbilical de los recién nacidos de madres seroreactivas a <i>T. cruzi</i> usando los iniciadores Tcz1/Tcz2. A , amplificadas obtenidos de recién nacidos en Oaxaca: 1, PM; 2, control positivo; 3, control negativo; 4-10 DNA problema. B , amplificadas obtenidos de RN en Jalisco: del 1-8 DNA problema; 9, control negativo; 10, control positivo; 11, PM.	86
Figura 12. Estructura del Bromuro de etidio.	137
Figura 13. Estructura de la agarosa.	137

ABREVIATURAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

RNA: Ácido ribonucleico

A: Adenina

T: Timina

C: Citocina

G: Guanina

mL: Mililitros

µL: microlitro

Kg: Kilogramos

g: Gramos

mg: Miligramos

µg: Microgramo

ng: Nanogramo

m²: metros cuadrados

OMS: Organización Mundial de la

Salud

OPS: Organización Panamericana de

la Salud

NO: Óxido Nítrico

TNF α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

IL-6: Interleucina 6

IFN- γ : Interferón gama

IgG: Inmunoglobulina humana G

IgM: Inmunoglobulina humana M

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia

Humana

Ag: Antígeno

Ab: Anticuerpo

pH: potencial de hidrógeno

kb: kilobase

N: Normal

µM: micromolar

D.O.: Densidad Óptica

DST: Desviación estándar

U: Unidades enzimáticas

p: Prevalencia

pb: Pares de bases

INTRODUCCIÓN

Definición de Enfermedad de Chagas

También conocida como Tripanosomiasis americana, fue descrita por primera vez por el Doctor Carlos Chagas en 1909, y es causada por el parásito protozooario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Es una infección parasitaria, sistémica y crónica en el 30% de los infectados que progresan a las formas graves como cardiopatía o mega formaciones digestivas. Es endémica en zonas rurales, sub-urbanas y en los suburbios más pobres de varios países del continente americano, desde el sur de los Estados Unidos hasta Sudamérica; representando un grave riesgo para la salud de los habitantes de estas regiones.^{1, 2}

Epidemiología

La enfermedad de Chagas se encuentra distribuida en casi toda el continente Americano, sus manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son variables entre una zona endémica y otra. La forma ideal de cuantificar su magnitud real como problema de salud pública, es a través de la presencia de vectores, seroprevalencia y sangre infectada en bancos de sangre. Los reportes actuales a nivel global en América Latina, no reflejan la verdadera magnitud del problema, la mayoría corresponden a estudios aislados y aproximaciones estadísticas realizadas en zonas endémicas de países con mayor presencia del vector; sin embargo, estas cifras no son iguales para zonas no endémicas. En relación a las cifras que ha reportado la OMS en los últimos veinte años para el continente Americano, se puede ver una disminución causada por el implemento de medidas de control en la transmisión vectorial establecidas en países del Cono Sur, como Argentina, Brasil, entre otros (Tabla 1).^{2, 3}

En América Latina, se estima que el número de individuos infectados es de 7.6 millones de personas en el 2006, provocó 14,000 muertes por año en el 2001 y 28 millones más corren el riesgo de contraerla. Se considera un problema de salud pública como resultado del aumento de la migración, ya que se reportan casos en Estados Unidos, Canadá, Europa, España, Australia, Japón, entre otros.⁴⁻⁶

La población en riesgo se define por la presencia del insecto vector en los domicilios y la población infectada a partir de encuestas seroepidemiológicas realizadas en áreas endémicas a diferentes tiempos, con métodos, criterios y planes de muestreo diferentes.^{7, 8}

En la Tabla 1, se observa cómo han cambiado las cifras reportadas de 1990 a 2006. La causa de estos cambios se debe a los programas de control en la transmisión vectorial y en bancos de sangre, lo que ha favorecido la disminución de la enfermedad de Chagas.⁸

Tabla 1 Cambios en parámetros epidemiológicos ocasionados por la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas, 1990-2000-2006.

Parámetros Epidemiológicos	1990	2000	2006
Muertes anuales	>45 000	21 000	12 500
Casos humanos de infección	30 millones	18 millones	15 millones
Nuevos casos anuales	700 000	200 000	41 200
Población en riesgo	100 millones	40 millones	28 millones
Distribución	21 países	21 países	21 países

Fuente: TDR/WHO, PAHO, WHO.

En la última “Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas”, realizada por la OPS en los 21 países endémicos en el 2006, se publicó la situación cuantitativa de la enfermedad. En América, existían 7,694,500 infectados, 41,200 casos nuevos de transmisión vectorial al año, 14,385 casos de Chagas congénito, 1,809,507 mujeres seropositivas entre 15 y 44 años, la tasa de prevalencia fue de 1.44% y la tasa de incidencia de 0.008%, la incidencia de Chagas congénito de 0.13%, la población expuesta en zonas endémicas fue 108,595,000 habitantes, los nacimientos por año fueron 10,832,950, las Cardiopatías 1,772,365 y la prevalencia en Bancos de sangre fue de 1.28%⁹

En México, se reportaron 1,100,000 infectados, 7,700 casos nuevos de transmisión por vector, 1,100 casos de Chagas congénito, 243,000 mujeres seropositivas entre 15 y 44 años, la tasa de prevalencia fue de 1.02% y la tasa de incidencia de 0.007%, la incidencia de Chagas congénito de 0.05%, la población expuesta en zonas endémicas fue 29,500,000 habitantes, los nacimientos por año fueron 2,159,000, las Cardiopatías 1,772,365 y la prevalencia en Bancos de sangre fue de 0.6%⁹

Mecanismos de transmisión

El mecanismo principal de infección es a través de las heces del insecto vector infectado con *T. cruzi*, el cual penetra por la piel o las mucosas de los reservorios mamíferos, incluyendo el hombre.¹⁰ Otros mecanismos importantes son la transmisión por transfusión de sangre o de los componentes sanguíneos contaminados y por trasplantes de órganos.¹¹ Un mecanismo de transmisión de menor frecuencia y del cual se conoce poco, es la transmisión vertical de la madre embarazada infectada al producto por vía transplacentaria o perinatal (connatal).¹² La ingestión de leche materna, los accidentes en laboratorios donde trabajan con el insecto vector y la ingestión de alimentos contaminados con orina o materia fecal de triatomíneos, han sido descritos como mecanismos particularmente raros.¹³

Ciclo Biológico

T. cruzi es un parásito heterogéneo, parte de su vida se desarrolla en el huésped vertebrado y la otra en el intestino del vector (Figura 1).

- Etapas en el ser humano: El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago infectado pica a un ser humano y defeca. Los tripomastigotes metacíclicos se encuentran en las heces (1), entran en el huésped a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas. Cuando entran en una célula humana, se convierten en amastigotes (2). Esta es la etapa reproductiva a través de la mitosis. Después de la reproducción, una gran cantidad de amastigotes se encuentran en la célula infectada, formando pseudo-quistes

(3). El amastigote se convierte de nuevo en tripomastigote y la célula se rompe. El tripomastigote vuelve a infectar otra célula, repitiendo el ciclo de multiplicación (4).¹⁴

- Etapas en el insecto: Cuando el insecto pica a un huésped infectado, y las heces están en contacto con mucosas o heridas expuestas, algunos tripomastigotes pasan a él a través de la sangre (5). En el intestino del insecto, se transforman en epimastigotes (6), los cuales representan la segunda etapa reproductiva (7). Después de la reproducción a través de mitosis, los epimastigotes pasan al intestino posterior, en donde se convierten en tripomastigotes metacíclicos (8) y se evacúan a través de las heces, mismas que pueden infectar a un huésped nuevo (1), repitiendo el ciclo.¹⁴

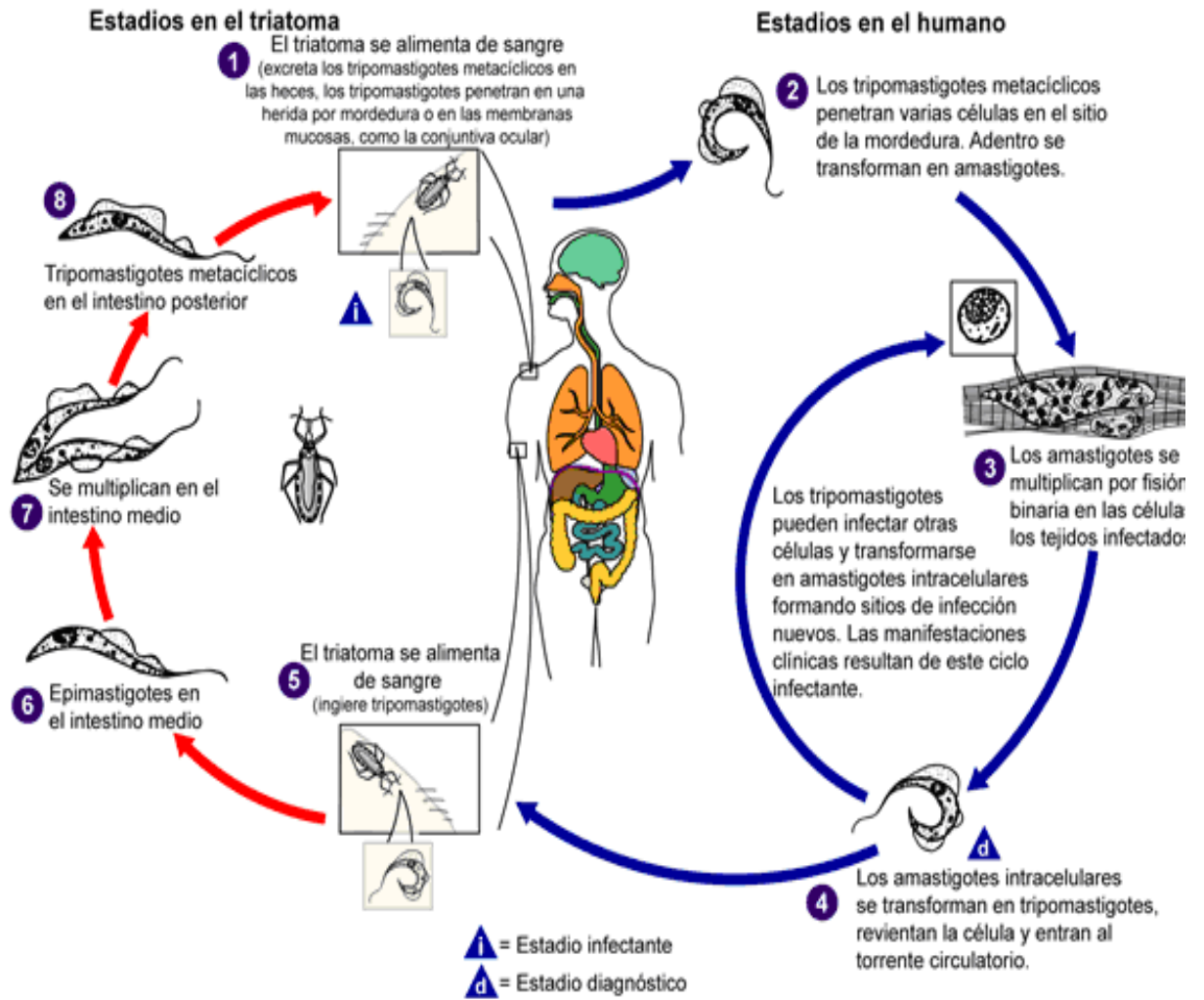


Figura 1 Ciclo Biológico de *T. cruzi*. Fuente: www.dpd.cdc.gov/dpdx

Vector

El insecto vector o transmisor, es un artrópodo hematófago que pertenece a la clase *Insecta*, orden *Hemíptera*, familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*. Todas las especies de triatominos son consideradas como vectores potenciales de *T. cruzi*, pero los de mayor importancia epidemiológica son aquellos que se han adaptado a las viviendas humanas y que tienen intervalos de tiempo corto entre la alimentación y la defecación.

En México, se han reportado un total de 31 especies de Triatominos, muy cercanos genéticamente, aunque se distinguen niveles morfológicos y algunos presentan variaciones geográficas. Los triatominos infectados de forma natural y de importancia epidemiológica para la transmisión del parásito a humanos son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzotti*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma phyllosoma* y *Triatoma picturata*.¹⁵

Tabla 2 Distribución de las especies de Triatominos de mayor importancia médica en toda la República Mexicana.

ESTADO	ESPECIES REPORTADAS
Aguascalientes	<i>T. longipennis</i>
Baja California	<i>Paratriatoma hirsuta</i> , <i>T. rubida</i>
Campeche	<i>T. dimidiata</i>
Colima	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. bolivari</i> , <i>T. picturata</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Chiapas	<i>T. dimidiata</i> , <i>R. prolixus</i>
Coahuila	<i>T. protracta</i> , <i>T. gerstaeckeri</i>
Chihuahua	<i>T. indictiva</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. protracta</i> , <i>T. recurva</i> , <i>T. gerstaeckeri</i>
Distrito Federal	<i>T. barberi</i>
Durango	<i>T. protracta</i> , <i>T. mazzotti</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Estado de México	<i>T. pallidipennis</i>
Guanajuato	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. mexicana</i>
Guerrero	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. mazzotti</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Hidalgo	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. mexicana</i> , <i>T. gerstaeckeri</i>
Jalisco	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. bolivari</i> , <i>T. brailowsky</i> , <i>T. picturata</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Michoacán	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. mazzottii</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Morelos	<i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Nayarit	<i>T. pallidipennis</i> , <i>T. longipennis</i> , <i>T. recurva</i> , <i>T. rubida</i> , <i>T. mazzottii</i> , <i>T. bolivari</i> , <i>T. brailowsky</i> , <i>T. picturata</i> , <i>T. dimidiata</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Nuevo León	<i>T. protracta</i> , <i>T. gerstaeckeri</i> , <i>T. lecticularia</i>
Oaxaca	<i>R. prolixus</i> , <i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. phyllosoma</i> , <i>T. mazzottii</i> , <i>T. bolivari</i> , <i>T. picturata</i> , <i>T. gomeznunezi</i> , <i>T. nítida</i>
Puebla	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Querétaro	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. barberi</i> , <i>T. mexicana</i> , <i>T. gerstaeckeri</i> , <i>T. pallidipennis</i>
Quintana Roo	<i>T. hegneri</i> , <i>T. dimidiata</i>
San Luis Potosí	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. mexicana</i> , <i>T. protracta</i> , <i>T. gerstaeckeri</i>
Sinaloa	<i>T. longipennis</i> , <i>T. indictiva</i> , <i>T. protracta</i> , <i>T. recurva</i> , <i>T. rubida</i> , <i>T. sinaloensis</i> , <i>T. phyllosoma</i>
Sonora	<i>T. incrasata</i> , <i>T. protracta</i> , <i>T. recurva</i> , <i>T. rubida</i> , <i>T. sinaloensis</i>
Tabasco	<i>T. dimidiata</i>
Tlaxcala	<i>T. barberi</i>
Tamaulipas	<i>T. protracta</i> , <i>T. gerstaeckeri</i>
Veracruz	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. rubida</i> , <i>T. gerstaeckeri</i>
Yucatán	<i>T. dimidiata</i> , <i>T. nítida</i>
Zacatecas	<i>T. longipennis</i> , <i>T. protracta</i> , <i>T. pallidipennis</i> , <i>T. phyllosoma</i>

Fuente: Taller Internacional de Epidemiología Diagnóstico y Control de la Enfermedad de Chagas. Noviembre, 2002.

Manifestaciones clínicas

Las personas infectadas con *T. cruzi* presentan tres fases en el transcurso de la enfermedad; estas son: la fase aguda, la indeterminada y la crónica. Después de la infección, los parásitos se pueden observar en sangre a partir del día 7 hasta el día 14 a causa de la intensa multiplicación parasitaria. En este periodo, todos los tejidos pueden ser invadidos, pero los más afectados son aquellos ricos en células del sistema retículo endotelial, los más frecuentes son los macrófagos, el tejido muscular cardíaco, el muscular estriado, músculo liso y en menor medida el tejido nervioso.¹⁶ Posteriormente se describen dos formas clínicas de la enfermedad de Chagas, la aguda y la crónica, con una etapa indeterminada entre ambas.

Fase aguda

Dura entre 10 y 15 días, pasa inadvertida la mayoría de las veces porque puede ser asintomática, o presentar síntomas de leves a poco característicos o en algunos casos se manifiestan síntomas generales provocados por cualquier entidad febril de otra causa. Dentro de los síntomas generales se encuentran la fiebre, cefalea, anorexia, mialgia, laxitud, vómitos, diarreas, palpitaciones, nerviosismo, artralgia, quebrantamiento general, linfadenopatías generalizadas, hepatoesplenomegalia y edema, principalmente. Se caracteriza por parasitemia elevada, reacción inflamatoria con infiltrado de diferentes tipos de leucocitos, reacción inflamatoria de tejidos blandos conocida como **chagoma**, lesión en párpados conocida como signo de Mazza-Romaña y diseminación de parásitos intracelulares en ganglios linfáticos y órganos como: bazo, médula ósea, corazón,

tubo digestivo, glándulas suprarrenales, cerebro y a veces ovarios, testículos y tiroides. Después de la fase aguda ocurre una respuesta inmunitaria que provoca disminución de la parasitemia y mantiene la infección en algunos focos selectivos. Este periodo dura desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los síntomas de la fase crónica, es conocida como fase indeterminada o latente que inicia entre la semana 8 a la 10 después de la fase aguda, puede durar meses e incluso años con un promedio de 10 a 20.¹⁷

Fase crónica

Se presenta en el 30% de los individuos infectados en fase aguda, puede adoptar diversas formas clínicas: cardíaca, digestiva, del Sistema Nervioso Central (SNC) y congénita. Se caracteriza por baja parasitemia y lesiones típicas en el corazón y el tubo digestivo.¹⁸ La forma más importante es la cardiopatía chagásica, considerada como el síndrome más común y peligroso, se desarrollan auto-anticuerpos contra endocardio, vasos sanguíneos e intersticio de músculo estriado; además, se observa la presencia de nidos de amastigotes. Se desarrolla hipertrofia, dilatación de cavidades, trombosis mural, adelgazamiento apical y aneurisma ventricular con mayor frecuencia en el ápice del ventrículo izquierdo. En algunos casos, puede ocurrir muerte súbita sin desarrollo de insuficiencia cardíaca congestiva.¹⁹ También se desarrollan lesiones hipertróficas del tubo digestivo o megavísceras, especialmente megaesófago y megacolon. En casos agudos hay presencia de destrucción neuronal que trastorna el funcionamiento peristáltico de la musculatura, ocasionando hipertrofia muscular y aumento considerable de los órganos hasta llegar a la muerte.¹⁹

La forma congénita puede provocar abortos, partos prematuros o una infección congénita caracterizada por hepatoesplenomegalia, anemia, daño neurológico progresivo, hemorragias cutáneas y alteraciones electrocardiográficas.²⁰

Diagnóstico

Varía de acuerdo con el estadio de la infección en que se encuentra el paciente:

Diagnóstico en la fase aguda

Cuando la enfermedad es reciente, el diagnóstico se realiza por la búsqueda del parásito en sangre periférica empleando métodos directos, los de concentración biológica y la detección del ácido desoxirribonucleico (DNA por sus siglas en inglés) del parásito. Los métodos como el examen en fresco, las preparaciones teñidas y el recuento de tripanosomas, se pueden realizar en el 100% de los casos y tienen una sensibilidad del 98% en esta fase.

Los métodos como la gota gruesa, la biopsia, el microhematócrito, el método de concentración de Strout y el de Bennet, reducen el tiempo de realización, son sensibles, pero se requiere equipo y material especial. Los de concentración biológica, como el xenodiagnóstico y el hemocultivo, tienen sensibilidades del 95 al 98% en fase aguda, pero ésta disminuye hasta un 30% en fase crónica y son muy tardados. La detección de antígenos parasitarios en sangre y orina ha sido propuesta, pero aún no está evaluada para incorporarse al diagnóstico de rutina. El diagnóstico indirecto mediante la búsqueda de IgM debe tomarse solo como dato orientador.²¹

Diagnóstico en la fase crónica

Se realiza con métodos indirectos buscando anticuerpos de la clase IgG; los más comunes son ELISA, Hemaglutinación Indirecta (HAI), Aglutinación Directa (AD), prueba de látex, Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y Fijación del Complemento (FC). Además, se emplean pruebas complementarias como el conteo de leucocitos, pruebas radiológicas y electrocardiográficas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece el uso de dos pruebas serológicas para dar un resultado positivo, debido a que comúnmente se encuentran pacientes positivos en una prueba y negativos en otra. En la actualidad, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es uno de los más recientes avances en el diagnóstico y el control del tratamiento de la enfermedad de Chagas; porque es posible detectar un parásito o un fragmento del DNA de *T. cruzi* en 20 µL de sangre con 99.9% de sensibilidad y 97.8% de especificidad en fase aguda.²²⁻²⁴

Tratamiento

Existen dos fármacos para el tratamiento específico contra *T. cruzi*, administrados durante la infección aguda a pacientes con parasitemia ocasionada por accidentes de laboratorio, por transfusiones, en pacientes transplantados y en infección congénita confirmada. Se utiliza un derivado nitrofurano (Nifurtimox) y otro nitroimidazol (Benznidazol), ambos capaces de generar efectos colaterales indeseables. El tratamiento debe ser prolongado, su acción es efectiva en la infección reciente y no en la fase crónica. El Nifurtimox actúa sobre ciertas enzimas necesarias para el metabolismo de los glúcidos y para la síntesis proteica, especialmente oxidando los radicales sulfidrilo (SH), indispensables para

el metabolismo del parásito. También tiene acción sobre las enzimas flavoproteicas y el citocromo C.²⁵ El Nifurtimox se administra una dosis oral diaria de 8 a 16 mg/Kg, dividido en tres dosis por 50 a 120 días. La recomendada para el Benznidazol es de 5 a 7 mg/Kg, durante 60 días.²⁶

ANTECEDENTES

Definición de Enfermedad de Chagas Congénita

La transmisión vertical o transplacentaria es una entidad clínica patológica causada por la transmisión de *T. cruzi* durante el embarazo, el parásito pasa a través de la sangre materna a la fetal y con el tiempo a sus tejidos. Por lo que la definición de Caso Congénito es todo Recién Nacido (RN) hijo de madre con diagnóstico de Chagas, antes o durante su embarazo; quien ha adquirido la infección durante la gestación por vía vertical o transplacentaria y puede cursar con o sin sintomatología, pero con examen de laboratorio positivo para infección por *T. cruzi*.²⁷

La infección congénita (del Latín *cum* –con- y *genitos* –engendrado-), implica la transmisión de parásitos vivos de forma prenatal (*in útero*) o perinatal (al momento del parto) excluyendo la transmisión postnatal de parásitos (principalmente a través de leche materna o por alimentos contaminados) y la transmisión de parásitos muertos, DNA del parásito u otras moléculas del parásito liberadas en la madre y que de la misma manera se encuentran en sangre fetal.²⁸

La *transmisión madre-hijo* o *transmisión vertical* también se puede dar de una generación a la siguiente, incluyendo prenatal, perinatal, así como transmisión postnatal de parásitos vivos. La *infección congénita con T. cruzi* se refiere a casos de infección asintomática como sintomática, mientras que el término *enfermedad de Chagas congénita* debería ser usado sólo para casos sintomáticos.²⁸

Historia

El mecanismo de la transmisión transplacentaria fue descrito por el Dr. Carlos Chagas en 1911, al realizar el primer registro de infección congénita por *T. cruzi* en dos recién nacidos con crisis convulsivas que fallecieron a los 6 días de vida y cuyas autopsias revelaron la presencia del parásito.²⁹ En 1914 Apt y colaboradores, realizaron experimentos para comprobar la transmisión vertical, observando la presencia de nidos de amastigotes en la placenta de ratones hembra infectadas; sin embargo, sus fetos no presentaron parásitos en sangre.³⁰ En 1921, Nattan-Larrier inoculó tripomastigotes de *T. cruzi* en cobayas grávidas y observaron alta incidencia de abortos y presencia del parásito en sangre y líquido amniótico de los fetos.³¹ En Venezuela, el primer caso humano de transmisión vertical confirmado lo reportó Dao 1949, describiendo el hallazgo del parásito en sangre de un recién nacido de dos días de vida.³² En Argentina, Jorg y Romaña, en 1953 describen los primeros casos congénitos humanos.^{33, 34} En Chile, Howard y Rubio en 1968 publican los primeros casos humanos;³⁵ mientras que en Brasil, Rezende y Bittencourt describieron manifestaciones clínicas que permitieron establecer que la enfermedad de Chagas congénita produce importante morbilidad.^{36, 37} En Bolivia, Azogue en 1985, publica el primer hallazgo de Chagas congénito.³⁸ En Paraguay, Russomando³⁹ reporta los primeros casos en 1998, poniendo especial interés en el tratamiento. En el 2005,⁴⁰ Mendoza y colaboradores publican la prevalencia de mujeres embarazadas infectadas y la frecuencia de transmisión congénita en una zona endémica del Perú. En el 2008, Sosa-Estani y colaboradores, tienen las publicaciones más recientes, en donde describen el uso de una prueba rápida (Stat-pack) para identificar la presencia de

anticuerpos anti-*T.cruzi* en sangre de cordón umbilical de mujeres embarazadas infectadas con el parásito de Argentina, Bolivia, Honduras y México.⁴¹

En México, el primer caso congénito lo publicó Gúzman-Bracho en 1998, correspondiente a una niña recién nacida prematura, con bajo peso al nacer, hepatoesplenomegalia y neumonitis. El diagnóstico se realizó identificando el parásito en la sangre de la recién nacida con preparaciones en fresco y por serología en la madre. Se le dio tratamiento y se realizó seguimiento durante dos años hasta obtener serología negativa en la niña y su mamá.⁴³ Posterior a este estudio, se desconoce la situación de la enfermedad de Chagas congénita en el país.⁴³

Epidemiología

La importancia de la frecuencia de la transmisión congénita de *T. cruzi*, depende directamente de dos indicadores epidemiológicos básicos:

- La tasa de prevalencia de infección en mujeres embarazadas.
- La incidencia de transmisión vertical.

La primera, varía en relación con el grado de endemidad de la infección por *T. cruzi*, en los diferentes países y regiones estudiadas. En Argentina, la prevalencia de gestantes chagásicas se estima en 7% aproximadamente; y en otros países endémicos como Bolivia, Perú y Paraguay oscila entre 5 y 40%.^{44, 28} En México, un estudio realizado en dos regiones endémicas reportó el 4.1% de gestantes infectadas.⁴³ Con relación a la incidencia de infección congénita, Argentina reporta 2.4%, Brasil 1%, Paraguay y Bolivia sus valores oscilan entre 4 y 12%; en México, no se tienen reportes.^{43, 28} Esta variación es atribuida al grado de endemia de la

región y a las características inmunológicas de la población estudiada. La tasa de transmisión no se ve afectada por la zona endémica, pero sí está asociada con la severidad y mortalidad en el recién nacido. Además, es necesario estandarizar los métodos diagnósticos porque pueden subestimar o sobrestimar la incidencia de transmisión.⁴⁵

La incidencia de la transmisión, vertical ha adquirido gran importancia debido a la urbanización de la enfermedad, causada por las constantes migraciones poblacionales desde las áreas endémicas, ocasionando nuevos casos en regiones y países donde no existe la transmisión vectorial. Los programas de control de la transmisión por vector y por transfusión sanguínea, están influyendo para que la infección congénita sea la vía de transmisión más importante en países endémicos, lo que demuestra que es un problema de salud pública.^{46, 47}

En la tabla 3, se reúne la información sobre prevalencia de infección en mujeres embarazadas y el grado de transmisión congénita en ellas, durante los periodos de tiempo y áreas geográficas estudiadas. **El grado de transmisión**, se define como **el número de casos congénitos/el número de madres infectadas con *T. cruzi***. El valor más alto reportado fue de 18.2% en Santiago de Chile.²⁸

Tabla 3 Principales reportes epidemiológicos en mujeres embarazadas y casos congénitos de infección con *T. cruzi* en países de América Latina.

PAIS	AREA	AÑO	MUJER EMBARAZADA SEROPOSITIVA		CASO CONGENITO		
			n/N	%	n/N	%	
ARGENTINA	BUENOS AIRES	87-97	ND	ND	71/1118	6.3	
		90-91	62/729	8.5	2/38	5.3	
		95-04	ND	ND	4/159	2.5	
		00-06	ND	ND	47	ND	
	CORDOBA	87-97	ND	ND	37/721	5.1	
		SALTA	80-97	ND	ND	102	ND
			<93	149/937	15.9	6/149	4.0
		<99	34/276	12.3	3/34	8.8	
		97-02	ND	ND	31/340	9.1	
	FORMOSA	09	-	29.1	8/47	17.0	
	SANTA FE	76-91	895/6123	14.6	9/341	2.6	
	TIERRA DEL FUEGO	01-02	61	ND	3/68	4.4	
	TUCUMAN	92-94	927/16842	5.5	26/364	7.1	
		06-07	34/518	6.6	ND	-	
	BOLIVIA	COCHABAMBA	92-94	444/1606	27.6	22/444	4.9
99-01			809/3879	20.8	47/809	5.8	
STA CRUZ		79-80	161/317	51.0	25	-	
		88-89	ND	ND	78 (13)	-	
		06-07	141/488	28.8	ND	ND	
		<09	154/530	29.0	10/154	6.5	
TARIJA		01	73/152	48.0	8/149	5.4	
		02-04	172/508	33.9	8/153	5.2	
	03-04	1144/2711	42.2	61/1176	5.1		
BRASIL	BAHIA	75-76	47/285	16.5	1/17	5.8	
		81-82	226/2651	8.5	3/186	1.6	
	GOIAS	75-04	145	-	2/278	0.7	
	SAO PAULO	<99	57	-	3/58	5.17	
NACIONAL	<04	36/15873	0.2	1/36	2.77		
CHILE	REGION III	82-83	31/869	3.6	0/3	0.0	
		REGION IV	<84	68/453	15.0	2/61	3.3
	85-87		279/1974	15.6	2/51	3.9	
	05-08		123/3324	3.7	2/80	2.5	
	SANTIAGO	57-68	ND	ND	30	-	
		<64	13/57	24.0	ND	ND	
		79	11/402	2.7	2/11	18.2	
		81-82	27/1000	2.7	3/27	11.1	
NACIONAL	82-90	ND	ND	24/336	7.1		
HONDURAS	INTIBUCA	06-07	22/500	4.4	ND	ND	
MEXICO	CHIAPAS, VERACRUZ	05-06	6/145	4.1	0/6	0.0	
	GUANAJUATO, YUCATAN	06-07	8/988	0.8	ND	ND	
	MICHOACAN	98	ND	ND	1 (16)	-	
PARAGUAY	ASUNCIÓN, SN PEDRO	91-92	172/1862	9.2	9/123	7.3	
	CORDILLERA, PARAGUARI	95-04	7802/61091	12.7	104/1865	5.5	
PERU	AREQUIPA	01-02	22/3000	0.7	0/22	0.0	

Fuente: Publicado en Carlier Y and Truyens C, 2010. American Trypanosomiasis Chagas Disease. DOI: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8. ND: No Determinado.

La tabla 4, resume las estimaciones realizadas por la OMS/OPS con relación al número de mujeres infectadas en edad fértil y con el número e incidencia de casos congénitos para cada país de América Latina durante el año 2005. Aproximadamente, 1,809,540 mujeres infectadas en edad fértil se encuentran en riesgo de transmisión congénita y 14,385 neonatos son infectados al año, la mayoría de estos se encuentran en Argentina, Bolivia y Brasil.³ En México, los estudios recientes sobre la enfermedad de Chagas Congénita, indican prevalencias maternas más altas de las esperadas sin publicar frecuencias de transmisión.⁴⁸

Tabla 4 Estimaciones de la OMS sobre mujeres embarazadas y casos congénitos infectados con *T. cruzi* en países de América Latina para el año 2005.

PAIS	POBLACIÓN	PREVALENCIA PROMEDIO DE INFECCIÓN CON <i>T. cruzi</i> (%)	MUJERES EMBARAZADAS INFECTADAS (n)	CASOS CONGÉNITOS	
				n	INCIDENCIA (%)
SUDAMERICA					
ARGENTINA	38,747,000	4.129	275,900	1,800	0.263
BOLIVIA	9,182,000	6.752	229,000	1,500	0.573
BRASIL	186,405,000	1.019	460,000	5,000	0.135
CHILE	16,267,300	0.985	34,600	445	0.181
COLOMBIA	45,600,000	0.956	107,800	1,000	0.104
ECUADOR	13,228,000	1.739	58,000	800	0.274
GUAYANAS	1,397,000	1.288	5,800	20	0.070
PARAGUAY	5,898,650	2.543	61,000	600	0.342
PERU	27,968,000	0.686	43,700	200	0.032
URUGUAY	3,305,700	0.656	5,300	20	0.039
VENEZUELA	26,749,000	1.159	68,000	600	0.102
CENTROAMERICA					
TODOS LOS PAISES	39,656,200	2.034	217,440	1,300	0.123
NORTEAMERICA					
MEXICO	107,029,000	1.028	243,000	1,100	0.051
TOTAL	522,432,850	1.448	1,809,540	14,385	0.133

Fuente: WHO 2006.

Evolución epidemiológica

Las investigaciones sobre la epidemiología de la infección congénita con *T. cruzi* muestran dos puntos importantes:

- (i) Existe la tendencia a reducir la incidencia en países endémicos de América Latina.
- (ii) La aparición de la enfermedad en áreas no endémicas fuera de América Latina.

La diferencia en los datos epidemiológicos reportados, sobre la infección congénita con *T. cruzi*, se debe en gran parte, a la falta de un método de diagnóstico estándar. Estudios previos realizados en Argentina y Bolivia, muestran a diferentes periodos de tiempo, variación en la incidencia de los casos ocasionada por las metodologías empleadas en el diagnóstico.^{49, 50}

En las últimas décadas, la migración de personas de América Latina ha probocado que la enfermedad de Chagas sea una enfermedad global, encontrando casos en Europa, Canadá, Japón y Australia, países en donde no hay transmisión por el insecto vector o en E.U.A., en donde la transmisión por vector al humano es muy esporádica. La migración de mujeres, favorece el incremento de la transmisión congénita en áreas no endémicas, reportado casos de enfermedad congénita en E.U.A., Suiza y recientemente España y Escocia.⁵¹

Características de la infección

La transmisión congénita de *T. cruzi*, puede ocurrir tanto en fase aguda como en la crónica de la infección materna y se puede repetir en cada embarazo durante el

periodo de fertilidad de la mujer. La mayoría de los casos de infección congénita provienen de madres con infección crónica, que fueron infectadas por el vector durante su infancia o por vivir en áreas endémicas. Sin embargo, la transmisión vertical del parásito, puede ocurrir a través de generaciones, de una madre infectada a su hija, quien transmitirá los parásitos a sus hijas y así sucesivamente. Todo esto puede contribuir a la formación de un grupo familiar de casos congénitos, observando los casos congénitos en hermanos.⁵² Tales características específicas de la infección con *T. cruzi*, sugieren que existe un riesgo particular en la transmisión madre-progenie, a través de un grupo de mujeres embarazadas infectadas en áreas tanto endémicas como no endémicas. El interés de la infección congénita con *T. cruzi*, es que puede extenderse fácilmente a través de la migración y el tiempo, por lo que se considera como problema de salud pública.⁵²

Respuesta inmune innata de la placenta

Estudios recientes muestran que los miembros de la familia de Receptores Tipo Toll (RTT o TLR, por sus siglas en inglés), incluidos TLR2 y TLR4, reconocen patrones moleculares asociados y son expresados por trofoblastos y sincitiotrofoblastos y en menor proporción en fibroblastos, células fagocíticas de Hofbauer (macrófagos) y células endoteliales.^{55, 56} La expresión de TLR está fuertemente aumentada durante la infección de la placenta, produciendo una respuesta inmune innata con la liberación de citosinas pro-inflamatorias, quimosinas, oxígenos reactivos e intermediarios del nitrógeno hacia la sangre materna.⁵⁶ Además, los receptores FcRn, expresados en trofoblastos, pueden

ayudar a fagocitar el parásito opsonizado por los anticuerpos. Estos mecanismos efectores innatos activados en la placenta, pueden reducir la parasitemia dentro del espacio intervelloso y limitar o prevenir la transmisión materno-fetal.⁵⁷ En estudios *in vitro* realizados en placentas infectadas con tripomastigotes, se ha visto disminución en el grado de multiplicación de los parásitos en las vellosidades incubadas con *T. cruzi*, provocando la muerte de los parásitos por la producción de Óxido Nítrico (NO). Los reportes de casos con inflamación de placenta sin infección congénita sugieren control de la infección por la respuesta inmune innata.⁵⁷

Patología e invasión de la placenta

La infección materna con *T. cruzi*, puede estar asociada a la inflamación de la placenta (placentitis), lo que puede causar un efecto protector. La alta producción de citosinas, como TNF α , provoca efectos adversos, que asociados a otros factores pueden inducir apoptosis en las células de la placenta y finalmente la ruptura de la barrera trofoblástica facilitando la infección fetal.⁵⁸ El análisis histopatológico de las placentas de abortos, partos o nacimientos prematuros de mujeres infectadas con *T. cruzi*, muestran importante vellositis con grandes áreas de destrucción de trofoblastos y necrosis. Además, los estudios de inmunohistoquímica, muestran respuesta inflamatoria importante, con infiltrados de macrófagos CD68⁺, linfocitos CD8⁺ y pocas células NK.⁵⁹

Otras características de la vellositis severa, son la presencia de macrófagos MAC387⁺ y Granulocitos CD15⁺ agrupados en el sitio de necrosis trofoblástica. La alta producción local de mediadores inflamatorios, tales como las especies

oxígeno reactivas, óxido nítrico y peroxinitrilo, pueden tener efectos deletéreos en la vascularización de la placenta.⁶⁰ Además, la liberación de citosinas inflamatorias dentro de la circulación fetal/umbilical, puede inducir grandes daños afectando el desarrollo del feto, así como, el síndrome de respuesta inflamatoria fetal, empeorando las consecuencias clínicas de la enfermedad de Chagas congénita y quizá contribuir a los abortos y mortalidad neonatal.⁶⁰

Se ha visto que en placentas de neonatos vivos infectados congénitamente la inflamación vellosa severa no se observa o se encuentra menos marcada. La necrosis y lisis están asociadas con infiltración de neutrófilos y linfocitos que son detectados muy frecuentemente en la placa coriónica (corionitis/corioamnionitis) y en cordón umbilical (funisitis). Igualmente, las lesiones de la membrana que rodea al feto pueden inducir su fragilización y su ruptura prematura; la cual, se observa frecuentemente en casos de infección congénita con *T. cruzi*. La placentitis enfocada y escasa, asociada a *T. cruzi* no reduce la transferencia de anticuerpos protectores de la madre al feto.⁶⁰

Rutas de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi*

Hematógena transplacentaria

La ruta transplacentaria, es la vía principal para transmitir parásitos de *T. cruzi* presentes en la sangre materna. Los parásitos necesitan cruzar la barrera trofoblástica u otro tejido placentario carente de defensa, antes de penetrar los vasos fetales embebidos en el mesénquima y finalmente cruzar la placa corionica (Figura 2). La transmisión del parásito por la vía materno-fetal puede realizarse a través de las membranas. Los parásitos penetran en el corion a nivel del seno marginal donde el revestimiento trofoblastico es incompleto (fibrina) y es una zona sensible. La propagación se puede dar en el seno de la placa corionica por proximidad, por la infección sucesiva de fibroblastos y de macrófagos que liberan tripomastigotes móviles hasta encontrar un vaso fetal, provocando entonces una infección fetal por vía hematógena. La infección congénita puede ocurrir por medio de los vasos de la placa corionica o por el cordón. También se puede adquirir en las células amnióticas por contigüidad. La infección de las vellosidades del trofoblasto y de las células de Hofbauer parece estar relacionada con parasitemia masiva. Las células gigantes infectadas sólo se observan en las placentas de niños con parasitemia elevada (1000 parásitos/mL).⁶¹

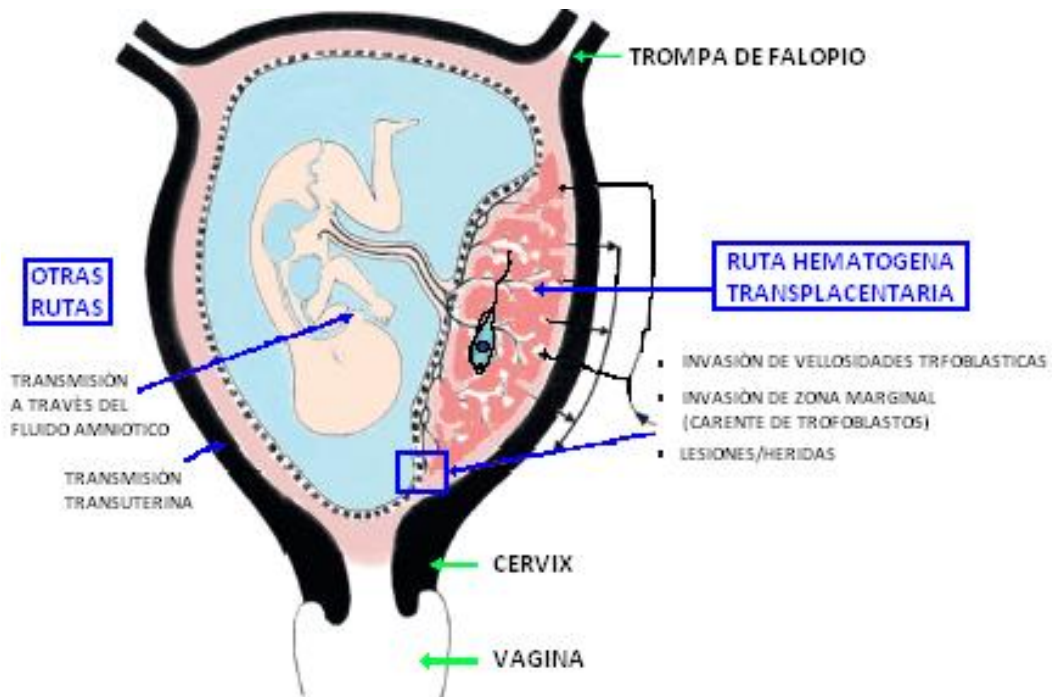


Figura 2 Rutas de la transmisión de *T. cruzi* a través de placenta. Modificado de: American Trypanosomiasis Chagas Disease. DOI: 10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8.

Invasión de trofoblastos por el parásito

Las vellosidades de la placenta humana están cubiertas por dos capas de trofoblastos: una capa exterior formada por sincitiotrofoblastos y una capa interior de citotrofoblastos (Células de Langhans). Las extravellosidades de los citotrofoblastos también cubren estructuras no vellosas. En un grado avanzado, solo el sincitiotrofoblasto está interpuesto entre la sangre materna y el tejido fetal, desde el citotrofoblasto, el número de células disminuye durante el periodo de gestación.⁶¹

Estudios *in vitro* mencionan que *T. cruzi* puede infectar y multiplicarse fácilmente dentro de las vellosidades de las células trofoblásticas humanas. El parásito,

induce la producción de actina cortical en células del citoesqueleto y la fosfatasa alcalina en placenta, estos pueden ayudar a *T. cruzi* a invadir y multiplicarse dentro de las células trofoblásticas. En un modelo experimental, utilizando sangre con parásitos vivos de *T. cruzi*, se identificó el DNA en el lado fetal del tejido placentario. Sin embargo, la presencia de DNA no es una prueba de infección, esto puede deberse a una contaminación transplacentaria transfiriendo hebras de DNA del lado materno. Además, en el estudio se usaron grandes cantidades de tripomastigotes sanguíneos (10^5 - 10^6 parásitos/mg de vellosidad corionica), superior al esperado en mujeres embarazadas infectadas crónicamente, mostrando parasitemias debajo de 15 parásitos/mL (estos son arriba de 3000 parásitos en los 200 mL de sangre contenida dentro del espacio intervelloso).⁶²

El análisis histopatológico de la placenta, en casos congénitos, presenta vellositis intensa asociada a *T. cruzi*, se observan parásitos en trofoblastos, así como amastigotes en células estromales. En estudios realizados en Brasil, Argentina y Bolivia, con placentas de casos congénitos, no se presentó de forma común la vellositis y los parásitos no fueron identificados en trofoblastos. Esto sugiere que los trofoblastos son una barrera potencial para *T. cruzi* y que la transmisión al feto (cuando ocurre), toma una ruta transplacentaria alternativa.⁶¹

Invasión de la placenta a través de áreas carentes de trofoblastos

En estudios histopatológicos, los parásitos se encontraron principalmente en placas coriónicas, membranas y cordón umbilical, asociados con corionitis y funisitis. Estas observaciones sugieren que los parásitos presentes en el espacio

intervalloso han encontrado una ruta a través de la placenta carente de defensas trofoblásticas. El análisis de biopsias seriadas realizadas en 19 placentas de recién nacidos infectados de Bolivia, mostró alta densidad de parásitos a nivel de la zona marginal con disminución gradual de la densidad en la placa corionica y membranas distantes.^{59, 63} En efecto, la zona marginal de la placenta unida a las membranas de las placas basales y coriónicas es conocida por estar constituida por células del músculo liso embebidas en la matriz fibrinoide extracelular y solo cubierto por un epitelio materno no trofoblastico. *T. cruzi* puede infectar y replicarse en células musculares y epiteliales fácilmente, del mismo modo facilita la invasión de las placas coriónicas y membranas. Además, expresa receptores de membrana para fibronectina, lo cual puede facilitar su adhesión a la matriz presente en la zona marginal.⁶⁴

A través de lesiones en la placenta

Las lesiones en la placenta pueden también facilitar la transmisión congénita de *T. cruzi* desde la sangre materna hacia las defensas trofoblásticas. Tales lesiones son el resultado del daño inducido por fuertes respuestas inflamatorias de la placenta y también parecen estar estrechamente relacionadas con el parto, particularmente durante la labor (daños ocasionados por las contracciones). Este mecanismo de transmisión puede ser relevante para la transmisión de tripomastigotes libres, así como de amastigotes en células infectadas y por el micro intercambio de células materno-fetales, que frecuentemente ocurre en sangre de cordón. La importancia práctica de esta forma de transmisión es que se puede limitar o prevenir si se elige la cesárea.⁶⁵

Migración de parásitos dentro del tejido corionico

Excepto en la microtransfusión a través de lesiones de placenta, los parásitos de *T. cruzi* han cruzado la barrera trofoblástica u otros tejidos placentarios y se encuentran dentro de tejidos corionico de las vellosidades y/o placa corionica, constituida por una mezcla de tejido conectivo fijado a fibras celulares, tales como los fibroblastos, miofibroblastos y macrófagos (células de Hofbauer). Los tripomastigotes de *T. cruzi* que no han sido destruidos por las células fagocíticas mesenquimales, pueden sufrir nuevos ciclos de multiplicación dentro de tales células, liberando nuevos parásitos móviles que infectan a otras células, como miocitos y células endoteliales del forro de los vasos fetales embebidos en las vellosidades coriónicas, placa coriónica o cordón umbilical, y ganan el acceso a la circulación fetal.⁶⁶

Otras rutas posibles para la transmisión

T. cruzi, también puede atravesar placenta e infectar al feto a través de parásitos liberados de las células amnióticas hacia el fluido amniótico (FA) (Figura 2). La presencia de parásitos dentro de la placa corionica y en membranas, da como resultado una infección secundaria de la capa contigua de células amnióticas (Corioamnionitis). Los parásitos liberados dentro del FA pueden contaminar al feto por la vía oral o pulmonar o eventualmente al penetrar piel desde el baño fetal en FA y la continua adsorción de este. Se tienen reportes de infección con *T. cruzi* en pulmón y piel de fetos y en recién nacidos muertos infectados.⁶⁷ El diagnóstico en estos casos, no se realiza por la observación del parásito al microscopio, se basa

en la búsqueda del DNA del parásito en FA o en el contenido del aspirado de fluido gástrico de recién nacidos infectados asintomáticos. Esta vía de transmisión es poco común en humanos y animales infectados experimentalmente, ya que *T. cruzi* se destruye por la acción de los péptidos anti-microbianos contenidos normalmente en FA.⁶⁸

La posibilidad de invasión fetal vía placenta, directamente por la pared uterina (ruta trans-uterina) está determinada por la presencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* que se observan en la decidua de la placenta de madres que han traído al mundo a neonatos infectados (Figura 2).⁶⁹

La transmisión post-natal del parásito a través del consumo de leche materna o alimentos contaminados tienen poca importancia epidemiológica. Sólo existe un reporte que menciona un recién nacido posiblemente infectado durante la lactancia. La presencia del parásito en leche materna durante la infección, pudo haber estado relacionada con la contaminación de leche con sangre de la madre.⁷⁰ En otros estudios no se observaron parásitos en leche de mujeres infectadas crónicamente.⁷¹ Los tripomastigotes sanguíneos, en contraste con los tripomastigotes metacíclicos, no pueden sobrevivir en el ambiente gástrico, el cual previene su transmisión a neonatos en los casos raros donde los parásitos pueden estar presentes en leche materna.⁷²

Regulación de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi*

Es poco probable que exista transmisión de tripomastigotes sanguíneos durante el primer trimestre del embarazo, ya que el espacio intervilloso placentario no

está abierto. La ausencia de malformaciones en los recién nacidos infectados congénitamente con *T. cruzi*, sugiere que no hay transmisión e interacciones dañinas del parásito en las etapas tempranas de la organogénesis del embrión.⁷²

Los abortos, óbitos y nacimientos prematuros en mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi*, son más frecuentes en las edades gestacionales de 19 a 37 semanas de embarazo, pero no se ha demostrado que sean ocasionados por la infección congénita. Los casos raros de infección aguda con *T. cruzi* reportados durante el embarazo, indican que la transmisión se da posiblemente alrededor de la semana veinte del embarazo. Sin embargo, en la mayoría de las mujeres embarazadas, para quienes están en fase crónica de una infección que ha sido adquirida mucho tiempo antes del embarazo, es imposible localizar el momento exacto de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi*.⁷³

Se puede suponer que la transmisión de parásitos sanguíneos ocurre más frecuentemente durante el segundo y tercer trimestre del embarazo (transmisión prenatal) y quizás también más cerca al parto o durante el periodo de labor (transmisión perinatal) a través de lesiones en placenta. Se desconoce la frecuencia de transmisión entre los partos vaginales o por cesarea.⁷³

Factores involucrados en la transmisión de *T. cruzi* a recién nacidos.

Los factores más importantes involucrados en la transmisión de *T. cruzi* y en el desarrollo de una infección congénita son el parásito, la madre y la capacidad fetal para responder a la invasión del parásito.

Genotipos de *T. cruzi*

T. cruzi es un parásito heterogéneo con linajes genéticos. Las diferencias filogenéticas pueden tener consecuencias relevantes en la transmisión congénita y en la patología neonatal.⁶² Se conocen seis genotipos de *T. cruzi*, de los cuales, Tc I, Tc II, Tc III, Tc V y Tc VI han sido identificados en casos de infecciones humanas congénitas reportadas en Sudamérica.⁷⁴ Bolivia, Argentina, Chile, Paraguay y el sur de Brasil, en Río Grande de Sol, predomina Tc V en un 80 a 100% de los casos congénitos reportados.⁷⁵ En neonatos de Argentina, Bolivia y las Bahías de Brasil, se ha identificado los genotipos Tc II y Tc IV y en Paraguay el Tc III.⁷⁶ En algunos neonatos de Colombia y Chile se identificó el genotipo Tc I.⁷⁷ Los genotipos detectados en madres, se encuentran en recién nacidos infectados y también en nacimientos de hermanos infectados congénitamente en partos consecutivos, confirmando que el embarazo no induce cambios en la población predominante de parásitos.⁷⁸

Carga parasitaria materna

La parasitemia en mujeres embarazadas, es un factor importante que favorece la transmisión congénita de *T. cruzi*. En Brasil, la transmisión materno-fetal se presenta en 8 de cada 15 casos reportados de mujeres embarazadas con infección aguda, esto indica que es mayor el riesgo de transmisión en mujeres embarazadas con alta parasitemia que en mujeres infectadas crónicas, en donde, los parásitos en sangre son difíciles de detectar (53% contra 1-12%, respectivamente).⁷⁹ La frecuencia de hemocultivos positivos para *T. cruzi* de

madres infectadas crónicas que transmiten el parásito, es dos veces más alta que en las madres que tienen partos de recién nacidos no infectados, con niveles de parasitemia estimados por PCR cuantitativa entre 1 a 12 parásitos/mL. Esta asociación significativa de parasitemia con transmisión congénita fue confirmada por el uso de una técnica de concentración de parásitos en tubos de micro hematocrito heparinizados.⁸⁰ El xenodiagnóstico de mujeres infectadas, presenta mayor positividad en el segundo y tercer trimestre del embarazo que en mujeres no embarazadas; sin embargo, la relación con la transmisión congénita no se ha realizado.⁸¹ En relación con estos resultados, se puede concluir que la parasitemia materna significativa en el espacio intervelloso es necesaria para hacer frente a las defensas endógenas de la placenta (eliminando una parte de los parásitos presentes en sangre materna) y encontrar con éxito una ruta óptima de transmisión.

Inmunidad materna y otros factores involucrados en la infección congénita

Durante el embarazo las madres transmisoras de la enfermedad de Chagas, producen menos IFN- γ y más IL-10, así como una deficiencia funcional en la producción de IL-2, provocados por el aumento de la carga parasitaria encontrada en la madre, favoreciendo la transmisión. Sin embargo, también se ha reportado que la inmunidad materna es un factor limitante para la transmisión y desarrollo de la infección en los fetos. Los anticuerpos maternos de la clase IgG específicos de *T. cruzi*, transferidos a través de placenta, juegan un papel protector en las madres y en los fetos ya que contribuyen en la reducción de la parasitemia.⁸²

La activación de la respuesta inmune innata en mujeres embarazadas, puede contribuir a limitar la presencia y severidad de la infección congénita. Un estudio realizado con madres infectadas y no infectadas mostró que las células mononucleares sanguíneas de madres infectadas producen niveles altos de IL-1 β , IL-6 y TNF α bajo estimulación con *T. cruzi*. Esta activación celular materna sobre-regula la capacidad del neonato no infectado para producir tales citosinas. Estudios previos, mostraron que las madres con parasitemia detectable presentaban niveles altos de TNF α sanguíneo y leucocitos bajos; las madres transmisoras de parásitos, tenían niveles circulantes de TNF α a diferencia de las no transmisoras. Estos datos sugieren mayor protección de la respuesta innata materna en las madres y su progenie, apoyando la teoría de la probable eliminación de parásitos opsonizados por monocitos activados.⁸³

Las madres que transmiten el parásito a sus fetos, muestran poca respuesta inmune mediada por células T y producen menos IFN- γ , los cuales contribuyen probablemente al incremento de la parasitemia. La reducción de la capacidad en la respuesta mediada por células T, después del embarazo, así como, en los grupos familiares de casos de infección congénita con *T. cruzi*, sugieren que algunas madres podrían estar predispuestas a repetir la transmisión de parásitos.⁸⁴

Otros factores maternos que también favorecen la transmisión congénita de *T. cruzi*, son la edad (mujeres jóvenes), si son primigestas, la desnutrición y la pobreza. La residencia en áreas de alta densidad vectorial en donde las mujeres embarazadas se exponen a múltiples re-infecciones con *T. cruzi*, contribuye al

incremento en la parasitemia materna. En Bolivia, se ha visto que estos factores incrementan la morbilidad y mortalidad de la enfermedad de Chagas congénita, mientras que en Argentina es poco común.⁸⁵

Co-infección materna

La co-infección materna del VIH en mujeres infectadas con *T. cruzi* incrementa la frecuencia y severidad de la enfermedad de Chagas congénita, destacando la importancia de la inmunidad materna y la alta parasitemia favoreciendo la transmisión del parásito al feto.⁸⁶

Estudios realizados en Bolivia en áreas endémicas a *T. cruzi* y *Plasmodium vivax*, se encontró que las mujeres embarazadas que presentan positiva la prueba del extendido grueso de sangre para *P. vivax*, tienen parásitos de *T. cruzi* y el grado de transmisión congénito es mayor que en las madres infectadas solo con *T. cruzi*.⁸⁷

Capacidad de la respuesta inmune del feto

El sistema inmune innato del recién nacido está influenciado por el daño de la respuesta inflamatoria que puede llevar el parto a pre-termino. Sin embargo, dicha respuesta puede ser inducida en los neonatos por la madre cuando se infectó con *T. cruzi*. Se ha observado la producción de citosinas inflamatorias en neonatos no infectados nacidos de madres infectadas, los niveles de marcadores inflamatorios y la activación de células NK son bastante bajas en los recién nacidos infectados congénitamente. Estos datos sugieren un aumento de la respuesta innata en los

bebés no infectados de madres infectadas, asociados con la capacidad de sus monolitos activados para eliminar parásitos. Sin embargo, dicha defensa es insuficiente en neonatos infectados congénitamente.⁸⁸

La respuesta inmune mediada por células T en etapas tempranas de la vida, es limitada, debido a la inmadurez relativa del sistema inmune. Se ha demostrado que los neonatos infectados congénitamente con *T. cruzi*, pueden sobreponerse a la inmadurez de su sistema inmune. Los recién nacidos infectados son capaces de montar una respuesta inmune T específica semejante a la CD8 en adultos produciendo INF- γ , importante en el control de la infección por *T. cruzi*. Los recién nacidos no infectados de madres infectadas muestran una respuesta específica mucho más baja.⁸⁹

La carga parasitaria en sangre de neonato o en cordón umbilical de un caso congénito, varía de 1 a 125,000 parásitos/mL, la parasitemia establece la severidad de la enfermedad de Chagas congénita. Los recién nacidos con la capacidad comprometida para producir INF- γ , muestran altas parasitemias y la forma más severa de enfermedad de Chagas congénita; esto sugiere que la respuesta mediada por células T juega un papel protector en los recién nacidos infectados congénitamente.^{90, 91}

Transmisión vertical de *T. cruzi* en otros mamíferos y en modelos experimentales.

En mamíferos reservorios naturales de *T. cruzi*

Varios mamíferos están involucrados en el ciclo selvático de la transmisión de *T. cruzi*. La posibilidad de transmisión vectorial, ha sido considerada como una vía de transmisión complementaria en la conservación de mamíferos reservorios de *T. cruzi*. La transmisión vertical se ha observado en algunas placentas de mamíferos infectados naturalmente, tales como conejos, perros y primates, viviendo en condiciones salvajes o en zoológicos.⁹²

Modelos experimentales de la transmisión congénita de *T. cruzi*.

Se han usado como modelos experimentales para la transmisión vertical de *T. cruzi*, al ratón y ratas.

Ratón

La inoculación de parásitos durante la gestación, afecta la infección aguda y/o el deterioro de la reproducción. La inoculación de Tc VI en ratones hembra BALB/c una semana después del apareamiento, induce un pico de parasitemia (fase aguda) en el día 19 o 20 de la gestación, la reproducción está totalmente dañada, 80% de los animales no se vuelven a embarazar debido a la inhibición de la pre-implantación del embrión desarrollado y el aborto de fetos implantados en el 20% restante de las hembras. Tales abortos no se debieron a la infección fetal, pero la infección masiva de placenta induce necrosis isquémica en feto y una alta producción de TNF α . Experimentos realizados en ratones Swiss, C3H y BALB/c, inoculados con parásitos a diferentes tiempos de la gestación, mostraron poca o ninguna transmisión materno-fetal. La infección congénita se confirmó en las crías por la detección de parásitos en el examen de sangre directo, hemocultivo, xenodiagnóstico o estudios histológicos. La transmisión puede estar asociada con algunas cepas de *T. cruzi*, aunque otras cepas muestran tropismo por la placenta y no infectan. Los parásitos pueden ser detectados ocasionalmente en la leche de ratones con infección aguda, pero no se ha observado la transmisión de la infección por esta vía.⁹³

En ratones hembras embarazadas Swiss, C3H y BALB/c con infección crónica, raramente se induce la transmisión congénita. En ratones Balb/c infectados crónicamente con Tc I, se han reportado PCR positivos en tejido en un 33% de los críos de 2 semanas de edad y en el 66% de ratones infectados con Tc IV. Sin embargo, una PCR positiva para *T. cruzi* en críos al momento del nacimiento, debe ser interpretada con cuidado debido a que pueden transferirse fragmentos de DNA de madres infectadas sin transmisión efectiva de parásitos vivos.⁹⁴

Ratas

Con el uso de métodos parasitológicos, se detectó que las ratas Wistar, AXC y Blancas inoculadas con parásitos durante la gestación, no mostraron transmisión congénita en el 7-9% de sus críos. En las ratas en fase aguda no se encontraron parásitos y no se observó transmisión post-natal a través de leche de rata. En un estudio realizado con benznidazol administrado en ratas embarazadas, se observó que éste cruza la placenta y llega al feto.⁹⁵

Aunque los ratones y las ratas tienen placentas semejantes a las de los humanos, la estructura de la barrera hemocorial y la interrelación del flujo sanguíneo madre-feto son diferentes, además del periodo corto de gestación. La extrapolación de los datos obtenidos en estos animales, dificulta la interpretación de lo que ocurre en la transmisión materno-fetal en humanos y sugiere que se realicen estudios en primates superiores no humanos.⁶⁰

Manifestaciones clínicas y grado de mortalidad

La infección congénita con *T. cruzi* en fase aguda, frecuentemente es asintomática durante las primeras semanas en un 40 al 100% de los casos. Sin embargo, las manifestaciones clínicas pueden aparecer a los días o semanas del nacimiento. Probablemente esto se debe a la alta frecuencia de parásitos transmitidos tardíamente durante el embarazo, reduciendo el periodo de tiempo para la multiplicación de los parásitos en el feto y la inducción de daño clínico evidente al nacer.^{28, 91}

Los signos y síntomas que se pueden observar en los recién nacidos con enfermedad de Chagas congénita no son específicos y se confunden con los ocasionadas por citomegalovirus y el virus del herpes simple (TORCH).⁹⁶ Generalmente, los recién nacidos infectados con *T. cruzi*, pueden mostrar algún tipo de alteración en el desarrollo, como Apgar bajo al minuto, bajo peso al nacer (<2500 g), edad gestacional <37 semanas (prematuro), dismadurez, o signos patológicos como síndrome de estrés respiratorio (SDR), hepatoesplenomegalia, neumonía y rara vez ictericia. La ruptura prematura de membranas se observa con frecuencia en mujeres embarazadas con enfermedad de Chagas congénita y puede dar como resultado, el nacimiento de recién nacidos prematuros con función pulmonar inmadura. El retardo en el crecimiento puede estar asociado con una difusión multisistémica en el feto.⁹¹

También se pueden observar manifestaciones clínicas severas en la enfermedad de Chagas congénita, como meningoencefalitis (induciendo un gran número de

signos, de temblores leves en la cara o convulsiones generalizadas) y/o miocarditis aguda (dando como resultado alteraciones del ritmo cardiaco y cardiomegalia). Se pueden observar Púrpura y edema (anasarca/hidropesía fetal en la forma severa). Se ha reportado anemia y trombocitopenia como principales alteraciones hematológicas. En raras ocasiones se han reportado megaesófagos o megacolon en casos congénitos; y se ha mencionado el daño ocular aunque no se descarta la posibilidad de coinfección con *Toxoplasma*. No se han detectado malformaciones en niños infectados.^{52, 91}

La mortalidad, puede ocurrir a los pocos días después del nacimiento, en casos severos de enfermedad de Chagas congénita sin tratamiento, con tasas menores al 15% en la mayoría de los estudios, pero cerca del 100% cuando ocurre coinfección con VIH.^{80, 91} Se ha observado que la proporción de abortos y mortinatos en mujeres infectadas crónicamente con *T. cruzi*, es similar o ligeramente más alta que en mujeres no infectadas. Sin embargo, no han sido investigados los resultados de la infección congénita contra la placentitis sin infección fetal.⁹¹

Es importante mencionar que los reportes clínicos más antiguos de la enfermedad de Chagas congénita en Argentina, Brasil y Chile, reportan índices de mortalidad y morbilidad superiores al 15%, con meningoencefalitis severa, cardiomiopatía, síndrome de estrés respiratorio y anasarca.⁹⁷ En estudios recientes, los casos reportados son frecuentemente asintomáticos y la meningoencefalitis o cardiomiopatía se observan en casos de coinfección con VIH. La comparación de los datos clínicos reportados no es fácil ya que son completamente diferentes, se

sugiere que la baja incidencia de infección congénita tiene tendencia hacia la disminución en la severidad de la enfermedad de Chagas congénita.^{91, 98}

Excepto en mujeres que presentan formas digestivas o cardíacas severas de la enfermedad de Chagas antes del embarazo, en general durante la gestación no hay desarrollo de la enfermedad en mujeres infectadas crónicamente, aunque sí se favorece la parasitemia.⁹⁹ Esto permite considerar a la infección congénita y la placentitis como las principales consecuencias de la infección con *T. cruzi* durante el embarazo.¹⁰⁰

Consecuencias a largo plazo de la infección congénita con *T. cruzi*

Los recién nacidos infectados con *T. cruzi* sin tratamiento, pueden desarrollar miocardiopatía Chagásica crónica o megavísceras digestivas entre los 25 y 35 años después del nacimiento, sin importar la morbilidad neonatal. Los casos congénitos no tratados con meningoencefalitis, pueden sufrir secuelas neurológicas severas. La transmisión del parásito entre las generaciones de una familia se presenta como consecuencia de la infección congénita a largo plazo.¹⁰¹

El sistema inmune del neonato infectado no tratado, puede estar expuesto al parásito, a antígenos del parásito y/o anticuerpos específicos del parásito (anticuerpos idiotipos que trabajan como antígenos sustitutos). Estos elementos transferidos de la madre pueden inducir respuesta inmune específica primaria o inducir tolerancia inmune específica susceptible al incremento de resistencia o susceptibilidad a re-infecciones subsecuentes.¹⁰² En cierto grado de parasitemia se ha observado respuesta específica en niños no infectados de madres

infectadas con *T. cruzi*, en donde, los neonatos infectados montan fuerte respuesta inmune celular tipo T1 a *T. cruzi*. Sin embargo, la consecuencia a largo plazo con relación a futuras re-infecciones y el desarrollo de la enfermedad aún se desconoce. La respuesta inmune heteróloga, se puede ver afectada en relación a las vacunas. Estudios recientes muestran que los niños con infección congénita desarrollan fuerte respuesta inmune tipo I a las vacunas contra hepatitis B, difteria y tétanos.¹⁰³

Diagnóstico de la Infección Congénita con *T. cruzi*.

El diagnóstico de laboratorio de la infección congénita con *T. cruzi* involucra, la detección de infección en mujeres embarazadas y la confirmación de la infección en recién nacidos de madres positivas.

Detección de la infección en mujeres embarazadas

Para confirmar la infección en mujeres embarazadas, es necesario tener resultados positivos por dos pruebas serológicas que detecten la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* (HAI, IFI, o ELISA).¹⁰⁴ Estas pruebas se deben realizar tan pronto como se ha diagnosticado el embarazo, aunque se pueden realizar en cualquier momento del embarazo incluyendo al momento del parto o en sangre del cordón umbilical (detección de anticuerpos maternos transferidos).²⁷ Algunas veces son necesarias pruebas más simples y rápidas como la inmunocromatografía, el inmunodot y la inmunofiltración, útiles en casos especiales como cuando la mujer embarazada entra en trabajo de parto, justo antes del parto y no se le ha realizado serodiagnóstico previo.^{27, 40}

Detección de infección fetal *in útero*

La prueba de PCR raramente detecta el DNA de *T. cruzi* en fluido amniótico recolectado previo o durante el parto, y la amniocentesis no se recomienda para el diagnóstico prenatal de infección congénita por *T. cruzi*.^{28, 105} Las muestras de sangre fetal (obtenida por cordocentesis, realizada por personal capacitado) se ha usado poco en el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi*, empleando métodos parasitológicos o moleculares.¹⁰⁶

Detección de infección neonatal

Las muestras de sangre, pueden ser colectadas al nacer del cordón umbilical o más tarde, directamente del neonato por veno-punción periférica (de talón, brazo o dedo). En caso de síntomas sugestivos de meningoencefalitis en los neonatos se puede usar el fluido cerebro-espinal.¹⁰⁶

Pruebas parasitológicas

Los tripomastigotes de *T. cruzi* vivos, se pueden detectar por examen microscópico directo de muestras de sangre fresca o preparaciones fijas, usando procedimientos estándares. Si los resultados son negativos, se pueden emplear técnicas de concentración, como la gota gruesa o el examen microscópico de la capa leucocitaria con tubos de microhematocrito heparinizados, en donde se pueden detectar alrededor de 40 parásitos/mL usando de 4-6 tubos,^{28, 107, 108} en las primeras 24 horas después de haber tomado la muestra. También se puede

usar el método de concentración alternativo Strout (también llamado microstrout usando micro-tubos).^{108, 109}

Los métodos parasitológicos indirectos, tales como el hemocultivo y el Xenodiagnóstico artificial, se pueden usar para detectar parasitemias bajas en la infección congénita con *T. cruzi* (limitadas a 20 parásitos/mL). Sin embargo, generalmente son más caros y se necesitan semanas para obtener resultados.^{28,}

107

Aunque para todos estos métodos se necesita personal bien calificado y controles de calidad regulares, la identificación del parásito en sangre confirma definitivamente la infección congénita. En caso de obtener resultados negativos al nacimiento, es necesario examinar otra muestra biológica, la misma semana o un mes después del nacimiento (esto aumenta la sensibilidad de detección cuando la transmisión congénita ocurre después del parto).^{28, 45}

Ensayo de PCR

En la búsqueda de un diagnóstico oportuno y certero que permita iniciar el tratamiento que garantice la cura total de la enfermedad de Chagas congénita al recién nacido, se ha recurrido al uso de la PCR como una herramienta alternativa para la identificación del parásito y diagnóstico oportuno.¹¹⁰

Se han realizado múltiples trabajos sobre el uso de la PCR en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, basados en la amplificación de secuencias repetitivas del DNAn (nuclear), o segmentos del minicírculo del DNAn (Kinetoplasto), pero aun

no se han establecido un par de iniciadores que sean utilizados en la identificación del parásito y que sean la base de una prueba diagnóstica comercial.¹¹⁰

La PCR es un método sensible, robusto, barato y simple que puede servir en la detección de neonatos infectados empleando cantidades pequeñas de sangre, obteniendo amplificados específicos de *T. cruzi*; sin embargo, si la prueba es positiva al nacimiento, se debe confirmar en muestras posteriores al nacimiento y complementar con serología.¹¹⁰

Otra alternativa es el PCR en tiempo real o cuantitativo, porque estima los niveles del DNA del parásito y puede ser una herramienta útil en la validación de resultados de PCR equivocados, pero aún no se ha desarrollado la prueba.¹¹¹

Identificación de anticuerpos IgM e IgA específicos vs *T. cruzi*

Los recién nacidos y bebés con transmisión congénita de *T. cruzi*, son identificados con muestras de sangre fresca en donde se observa la parasitemia. Se sabe que la respuesta del bebé a la infección con *T. cruzi* puede ser diagnosticada por la identificación anticuerpos tempranos como la IgM e IgA, ya que la búsqueda de anticuerpos IgG en bebés es útil solo después de los seis meses de vida debido al paso de la inmunoglobulina materna a través de la placenta. Sin embargo, se ha demostrado que la IgM y la IgA son de poca utilidad para el diagnóstico de la infección congénita de Chagas, debido a su baja especificidad ya que no están presentes en todos los recién nacidos positivos por pruebas parasitológicas y también se pueden identificar en recién nacidos no

infectados de madres infectadas. Por lo tanto, esta prueba no se recomienda para el diagnóstico de la infección congénita.^{28, 112}

Identificación de antígenos específicos

El diagnóstico serológico de la infección con *T. cruzi*, empleando antígenos recombinantes y péptidos sintéticos, ha aumentado debido al incremento en la sensibilidad de las pruebas. El antígeno recombinante SAPA (Shed Acute Phase Antigen), es reactivo con anticuerpos fetales IgM e IgG presentes en sangre de cordón de recién nacidos infectados con *T. cruzi*.¹¹³

El Inmunoblot con antígenos de tripomastigotes de excreción-secreción (TESA blot), permite identificar anticuerpos IgM e IgG, reconociendo bandas antigénicas específicas de *T. cruzi* durante la infección congénita, pero no se identifican en casos de infección crónica. El ensayo Dot blot permite identificar casos congénitos detectando anticuerpos IgG reconocidos por el antígeno SAPA en fetos o neonatos infectados y que no son transferidos de la madre. Sin embargo, estudios recientes indican que los anticuerpos específicos a SAPA también se detectan en pacientes crónicos incluyendo la mayoría de las madres.¹¹³

Identificación de antígenos solubles del parásito.

Se ha propuesto la identificación de antígenos solubles de *T. cruzi* en orina y suero con la prueba de ELISA para el diagnóstico de casos congénitos. Sin embargo, esta prueba no detecta todos los casos infectados.¹¹⁴

Histopatología de placenta

En el diagnóstico de la infección congénita se han considerado los estudios inmunoenzimáticos, la histopatología, el análisis por PCR o los cultivos *in vitro* de biopsias de placenta; sin embargo, el parasitismo en placenta puede no ser detectado en neonatos infectados congénitamente, o al contrario, se observa en recién nacidos no infectados. En realidad, la presencia de parásitos en placenta no confirma necesariamente una infección congénita, ya que la defensa de la placenta es capaz de contener la infección parasitaria antes de que ocurra en los neonatos. Es por esto, que en la actualidad, el análisis de la placenta no se recomienda para el diagnóstico de la infección congénita con *T. cruzi*.^{28, 59, 115}

Identificación de la infección congénita con *T. cruzi* en niños.

Si un recién nacido de madre infectada con *T. cruzi* presenta resultados negativos con las pruebas parasitológicas mencionadas o por PCR, o si no fue posible realizarle tales pruebas; se puede llevar a cabo la identificación de anticuerpos específicos usando ensayos serológicos estándar que puedan identificar anticuerpos IgG propios del niño y no de la madre. Algunos estudios indican que entre 8 – 9 meses después del nacimiento ya no hay anticuerpos maternos; por lo

tanto, el resultado negativo en una prueba serológica a los 8 meses de edad indica ausencia de infección congénita. Por el contrario, un resultado positivo en serología a esta edad, indica que el infante está infectado. Además, se afirma que el origen de la infección con *T. cruzi* fue por la vía congénita cuando se descartan otras vías de transmisión, por ejemplo, en zonas endémicas por el vector o en áreas no endémicas por transfusiones sanguíneas.^{28, 49}

La identificación de anticuerpos IgG específicos de SAPA en niños después de 3 meses de edad, puede ser una alternativa más rápida en el diagnóstico de la infección congénita, tales anticuerpos desaparecen antes que los anticuerpos IgG transferidos de la madre (identificados por serología). Sin embargo, los reactivos necesarios no están disponibles comercialmente, se requiere validar este procedimiento.^{116, 117}

Recomendaciones de la OMS.

En la actualidad, la OMS recomienda que el diagnóstico de la infección congénita se realice por la detección de parásitos sanguíneos a cualquier edad después del nacimiento y/o por serología positiva después de 8 meses de edad. El diagnóstico oportuno permite iniciar rápidamente con el tratamiento y seguimiento del recién nacido, lo que tendrá como consecuencia la cura total de la infección.¹¹⁸

Tratamiento de la infección congénita con *T. cruzi*

El tratamiento de la infección/enfermedad de Chagas con aplicación pediátrica tiene como objetivos principales limitar la morbilidad y mortalidad de la infección

aguda en el recién nacido y prevenir el desarrollo de la enfermedad crónica en la edad adulta. El tratamiento con drogas tripanomicidas se debe administrar tan pronto como se diagnostique, en todos los casos de infectados congénitamente con *T. cruzi*. El benznidasol¹¹⁹ y el nifurtimox¹²⁰ pueden usarse en el tratamiento de los casos congénitos. Las dosis recomendadas del benznidasol y del nifurtimox son 5 – 10 mg/Kg/día y 10 – 15 mg/Kg/día respectivamente, divididas en dos subdosis orales para neonatos y niños de hasta un año de edad, con duración de hasta 60 días de tratamiento (el tiempo de duración del tratamiento no puede ser menor de 30 días). El uso de dosis más bajas, es recomendable para niños por encima de un año.¹¹⁸ Tratamientos prolongados adaptados al incremento del peso corporal no son fáciles de llevar a cabo en las formulas pediátricas. Es importante que se use una suspensión del fármaco en lugar de tabletas. Es de gran importancia el papel que juega la familia para llevar a cabo correctamente el tratamiento, ya que se requiere una estrecha relación entre la familia afectada y el pediatra.¹²¹

Los efectos secundarios en adultos no se presentan en neonatos tratados con benznidasol, y en los que recibieron nifurtimox, los efectos son poco frecuentes. Para confirmar el éxito del tratamiento, se debe repetir la serología en el neonato tratado hasta que sea negativa; en algunos casos se ha prolongado hasta 16 meses después de iniciado el tratamiento. Posterior a este periodo de tiempo y con el resultado negativo en la serología, se puede decir que la eficacia terapéutica fue del 90 al 100% en los niños tratados antes del año de vida.¹²²

Prevención y control de la infección congénita con *T. cruzi*

La profilaxis primaria contra la infección fetal con *T. cruzi*, tiene como objetivo evitar la infección de la mujer embarazada. Se recomienda limitar el riesgo de contaminación con el insecto vector o con transfusiones sanguíneas y tratar a todas las niñas infectadas antes de la adolescencia.¹²³

El objetivo de la profilaxis secundaria es evitar la transmisión del parásito de una mujer embarazada infectada a su recién nacido, utilizando drogas tripanomicidas. Sin embargo, los efectos teratogénicos potenciales de ambos fármacos, aún se desconocen. No se recomienda el uso de estos dos fármacos durante el embarazo porque su eficacia está limitada en la fase crónica de la infección y la mayoría de las embarazadas se encuentran en esta fase.²⁸

La mejor estrategia de control está asociada con la identificación de la infección congénita en recién nacidos, mediante pruebas diagnósticas de laboratorio (búsqueda parasitológica de recién nacidos de madres infectadas y/o niños con serología positiva después de 8 meses de edad) y el tratamiento efectivo de los neonatos positivos. El costo/beneficio de esta estrategia es más bajo que el costo acumulativo al mantener por años a los pacientes chagásicos. Además de reintegrar a los niños infectados a una vida activa sin efectos secundarios, ni la posibilidad de que trasmitan al parásito.¹²⁴

FUNDAMENTO DE LAS METODOLOGÍAS

Pruebas inmunológicas

Inmunocromatografía (Chagas Stat-Pak)

Es una prueba de tamizaje que emplea un anticuerpo específico (anti-IgG humana) unido a una proteína conjugada a colorantes y una combinación de antígenos recombinantes (B13, IF, H49/JL) que están fijados a una membrana que retiene los anticuerpos específicos, conjugados con partículas coloreadas. Cuando la muestra fluye a través de la membrana, las IgGs humanas presentes en el suero de individuos infectados se asocian a las partículas coloreadas. Si la muestra contiene anticuerpos anti *T. cruzi*, estos se unirán al antígeno fijado a la membrana produciendo un complejo Ag-Ab que es evidenciado por la formación de una banda rosa-púrpura en la zona de reacción (Positivo). En ausencia de anticuerpos específicos no se forma la banda, el diluyente continúa su migración y solo produce una banda coloreada en la zona de control, la detección de esta línea demuestra que el reactivo está funcionando correctamente (Negativo) (Figura 3).¹²⁵



Figura 3 Interpretación de los resultados de la Inmunocromatografía para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en sangre, suero o plasma.

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)

Este método utiliza anticuerpos conjugados a una enzima. En los conjugados, el anticuerpo conserva su capacidad de unión específica al antígeno, mientras que la enzima es capaz de catalizar una reacción de oxidación-reducción, en la cual el sustrato o un cromógeno se transforma en un grupo colorido. En este sistema, el antígeno o el anticuerpo se adsorben a una fase sólida insoluble (en los pozos de la placa).

Existen variantes del método, como son los métodos directos, indirectos, de captura y el método de ELISA competitivo. En los directos, el anticuerpo dirigido específicamente contra el antígeno lleva la enzima. En los métodos indirectos el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con un primer anticuerpo, el cual ya reaccionó con el antígeno adsorbido a la fase sólida. En el método de captura o en sándwich, el conjugado enzima-anticuerpo reacciona con el antígeno que se ha unido antes a un primer anticuerpo, adsorbido a una fase sólida. El o los componentes que no reaccionaron se eliminan con lavados; por último se agrega el sustrato de la enzima y se mide la intensidad del color desarrollado, el cual es proporcional a la magnitud de la reacción antígeno-anticuerpo.

El método de ELISA es muy versátil, tiene múltiples aplicaciones, es económico, no produce desechos radiactivos, los conjugados enzima-anticuerpo son estables durante periodos de tiempo prolongados, es un método simple, específico, reproducible y muy sensible (ng). La reacción se puede cuantificar en un fotocolorímetro o densitómetro (Figura 4).¹²⁶

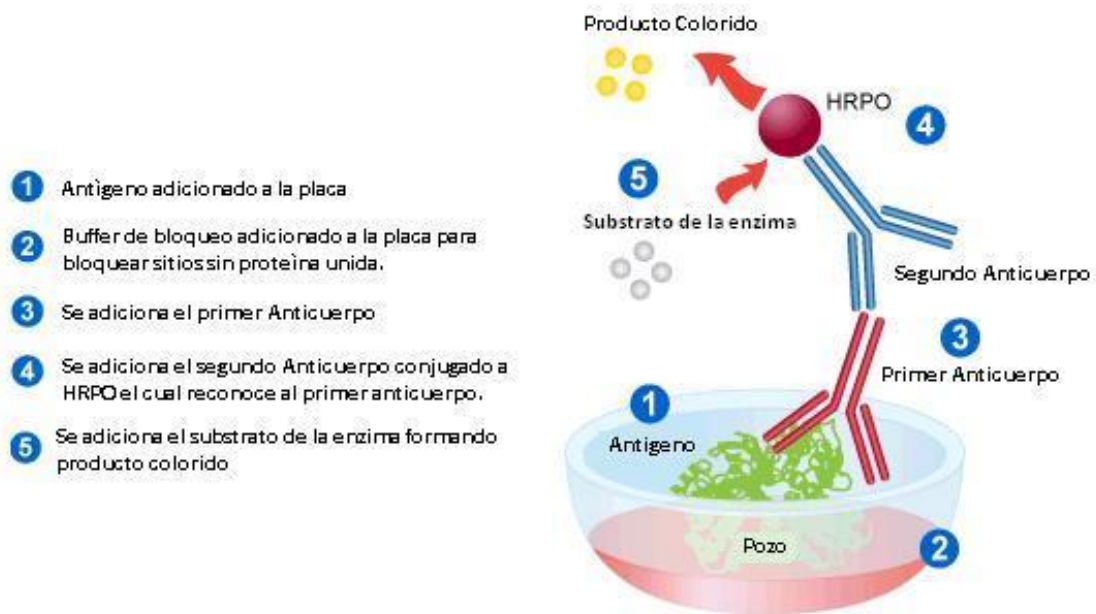


Figura 4 Método de ELISA para la identificación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de mujeres embarazadas.

MicroELISA recombinante. (ACCUTRACK CHAGAS)

Es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo, no competitivo, basado en el método indirecto de tercera generación debido al uso de antígenos recombinantes para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en muestras de suero o plasma humano. Los antígenos se obtienen por técnica de DNA recombinante y representan epítopes inmunodominantes correspondientes a los estadios epimastigote y tripomastigote de diferentes cepas de *T. cruzi*.

Una dilución apropiada de las muestras se incuba en pocillos de poliestireno, recubiertos con antígenos purificados de *T. cruzi*. Los anticuerpos contra *T. cruzi* son específicamente capturados por esos antígenos, quedando unidos a la fase sólida. Luego de varios lavados, a fin de eliminar las inmunoglobulinas no capturadas, el sistema se incuba con un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado a peroxidasa. Este conjugado reacciona específicamente con los anticuerpos contra *T. cruzi* inmunocapturados. El conjugado no unido se desecha por lavado y se revela la presencia de peroxidasa mediante el agregado de peróxido de hidrógeno/tetrametilbencidina como sustrato cromogénico. Esta incubación da como resultado la aparición de un color azul cuya intensidad depende de la concentración y de la afinidad de los anticuerpos contra *T. cruzi* de la muestra. La reacción enzimática puede ser detenida mediante el agregado de ácido sulfúrico, lo que produce un viraje de color hacia el amarillo espectrofotométricamente cuantificable.¹²⁷

Pruebas moleculares

Extracción de DNA

La extracción y purificación del DNA, es el primer paso de cualquier análisis genético. La selección del método de extracción está determinada por la estructura celular de cada organismo y la aplicación que se requiere; esto es, depende de la fuente, del tipo de DNA que se requiere y el nivel de integridad con el que se pretende recuperar dicho material. En general, dada la complejidad macromolecular, los ácidos nucleicos son difíciles de separar de los componentes de membrana (lípidos, proteínas, carbohidratos) y de otras moléculas solubles (polisacáridos). Existen métodos que alteran la estructura y características del DNA que son capaces de eliminar impurezas de las preparaciones basándose en las propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos.¹²⁸

En la actualidad, la automatización en los procesos de extracción del material genético permite obtener muestras con elevado grado de pureza de manera sencilla y rápida. Todos los métodos de extracción comparten cuatro pasos fundamentales que son:

- a) Lisis celular
- b) Desnaturalización de las proteínas asociadas al DNA o RNA para su separación
- c) Degradación y/o separación del DNA o RNA.
- d) Purificación final y recuperación del DNA o RNA.

Método de extracción de DNA con fenol/cloroformo/alcohol isoamilico.

Es uno de los métodos más usados para el aislamiento y concentración de DNA. La primera etapa es la lisis de las membranas celulares externas y nucleares ocasionado por la acción de detergentes y enzimas proteolíticas, liberando el material genético. En la segunda etapa, se lleva a cabo la extracción orgánica de las proteínas contaminantes que son desnaturizadas y depositadas entre la fase acuosa y la fase orgánica; los ácidos nucleicos permanecen en la fase acuosa. El fenol a pH 8, previene los productos oxidativos que dañan los ácidos nucleicos. La mezcla fenol/cloroformo desnaturiza las proteínas y las precipita en la interfase. Finalmente, la precipitación con etanol en presencia de sales, ocasiona que los ácidos nucleicos formen un precipitado blanco en forma de malla que pueda ser separado por centrifugación. Es un procedimiento tardado pero con gran eficiencia en el rendimiento y pureza.¹²⁹

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en ingles)

Descrita en 1986 por Kary Mullis, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA molde partiendo de una doble hebra.¹³⁰ Es un proceso bioquímico in vitro mediante el cual las cadenas individuales de DNA blanco son duplicadas por una enzima polimerasa (Taq polimerasa) a partir de moléculas de DNA de cadena sencilla denominadas iniciadores, los cuales se utilizan en cada ciclo de la reacción. Al final de cada ciclo, las cadenas nuevas vuelven a ser duplicadas por la enzima logrando una producción exponencial del segmento de DNA específico. El procedimiento consta de los siguientes tres pasos:

- Desnaturalización. Se separa la doble hebra de DNA por el efecto de la temperatura rompiendo los puentes de hidrógeno hasta tener cadenas sencillas. La PCR inicia con un calentamiento a 94°C por un tiempo corto variable.
- Alineamiento. La temperatura disminuye hasta 50-65°C para permitir que se unan el DNA con los cebadores o iniciadores. Los iniciadores están diseñados para reconocer una región específica de DNA que se quiere amplificar.
- Amplificación. Se aumenta la temperatura a 72°C para permitir que la enzima Taq Polimerasa reconozca y se una a los iniciadores, comenzando la síntesis de la cadena complementaria de DNA.

El número de moléculas generadas = número inicial de moléculas $\times 2^n$.

n = número de ciclos

Los iniciadores son los componentes críticos en la PCR, dan especificidad por la región de interés y son seleccionados por flanquear la secuencia del DNA de interés. Son secuencias de DNA de 10 a 22 pb de cadena sencilla, capaces de unirse a una región del DNA adyacente a la secuencia blanco deseada (Figura 5).¹³⁰

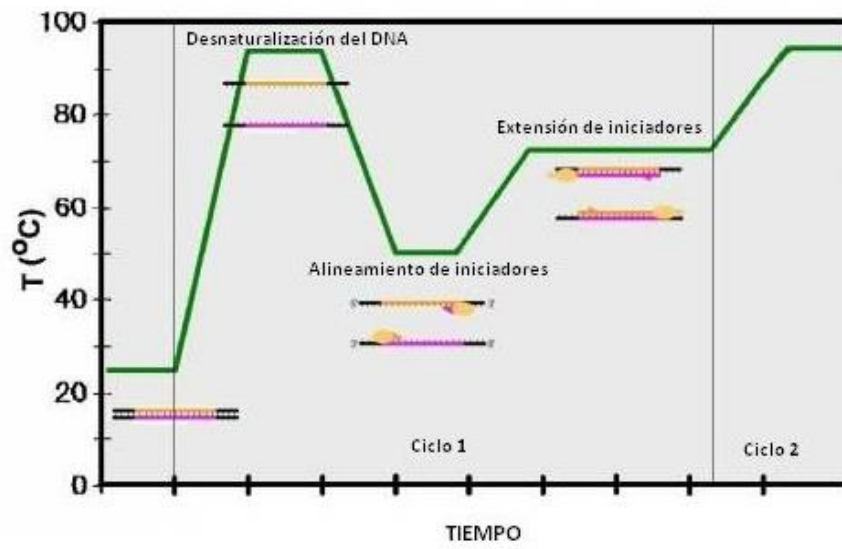


Figura 5 Gráfica con los pasos de la PCR.

Electroforesis en gel de agarosa

Se basa en la capacidad de desplazamiento de las moléculas cargadas sobre un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. A pH alcalino, las moléculas de DNA poseen una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad sea hacia el polo positivo y que esté determinada por el tamaño de las moléculas (número de pares de bases). Los cromosomas eucariotas son demasiado grandes para ser identificados por este tipo de análisis por lo que comúnmente se realiza con DNA fragmentado con nucleasas.

La separación de los fragmentos de DNA de doble cadena se realiza por electroforesis en gel de agarosa o en gel de poliacrilamida. En ambos casos, el gel se prepara con distintas concentraciones en función del tamaño de los fragmentos del DNA que se quiere separar. Las moléculas de DNA compuestas por hasta 2000 nucleótidos por lo general se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida y las de 500 nucleótidos y hasta 20 Kb en gel de agarosa. Modificando la concentración de acrilamida o agarosa se consigue obtener una mejor resolución de los fragmentos separados.¹³¹

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La enfermedad de Chagas congénita es la tercera vía de transmisión de *T. cruzi* al humano en cuanto a la frecuencia que ocurre. La importancia de este padecimiento va en aumento, a causa del éxito en los programas de prevención y control en la transmisión por el insecto vector y a través de transfusiones sanguíneas. Sin embargo, representa un problema de Salud Pública porque no se cuenta con ningún tipo de intervención para su control y la oportuna atención de los recién nacidos positivos a la infección con el parásito.

En América Latina, se estima que existen cerca de dos millones de mujeres en edad reproductiva infectadas con *T. cruzi*; de las cuales entre 4 y 8% transmitirán la infección al feto por vía transplacentaria, por consecuencia, se calcula que nacerán 15,000 niños con Chagas congénito al año y la gran mayoría asintomáticos. En la literatura nacional o internacional no existen reportes de la tasa de transmisión congénita por *T. cruzi*. Los estudios reportados en el 2004, indican una prevalencia materna de 4.1% en zonas endémicas, sin embargo, no se encontraron casos de transmisión.⁴³

En vista de la falta de información sobre la magnitud de la tasa de transmisión congénita de *T. cruzi*; es importante diseñar un estudio que permita no solo conocer la magnitud en la transmisión madre-hijo en población mexicana, sino también aplicar estrategias de laboratorio de alta sensibilidad, que permitan la identificación de los casos congénitos, de igual manera administrar el fármaco en los casos positivos y determinar la eficacia terapéutica, antes del primer año de vida del recién nacido. Además, es necesario proponer estrategias de prevención a todos los niveles.

En este trabajo se demuestra la importancia de plantear una estrategia para identificar a las mujeres infectadas y la tasa de transmisión de la infección a sus recién nacidos infectados por la vía congénita. También, se demuestra que es necesario informar a las Organizaciones, Instituciones y Autoridades de Salud del país sobre la presencia de casos positivos, establecer la magnitud del problema, proporcionar tratamiento a los niños positivos con la seguridad de otorgarles el 100% de posibilidad de cura, evitando la morbilidad y mortalidad de estos niños.

HIPÓTESIS

Si en México se presenta la transmisión de la enfermedad de Chagas por la vía materno-fetal entonces el tamizaje de mujeres embarazadas y el seguimiento de productos de madres seropositivas permitirán la detección y tratamiento oportunos para la curación de los niños infectados.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas y el porcentaje de transmisión de *T. cruzi* a sus recién nacidos, en dos zonas endémicas de México.

OBJETIVOS PARTICULARES

- √ Estudiar mujeres embarazadas, con más de 32 semanas de gestación, que acuden al servicio de gineco-obstetricia de Instituciones de salud de Oaxaca, Jalisco y el D.F.
- √ Obtener información epidemiológica y obstétrica de las mujeres embarazadas, así como los datos de somatometría del recién nacido, para determinar posibles factores de riesgo.
- √ Determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero de mujeres embarazadas empleando un método comercial rápido y por la técnica de ELISA no comercial.
- √ Corroborar la presencia de parásitos de *T. cruzi* en sangre de cordón umbilical de recién nacidos de madres seropositivas a la enfermedad de Chagas empleando la técnica de PCR.
- √ Determinar la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en el suero de niños positivos a PCR, después de dos años de nacidos y calcular el porcentaje de transmisión.
- √ Administrar el tratamiento específico a los niños positivos hasta que resulten negativos a las pruebas diagnósticas.
- √ Estimar la eficacia terapéutica en el grupo de recién nacidos tratados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Población de estudio.

El estudio se realizó durante el periodo de septiembre del 2006 a junio de 2008 en un total 1448 mujeres embarazadas con más de 32 semanas de gestación, así como en sus recién nacidos, que asistieron a cuatro hospitales ubicados en áreas endémicas a la infección con *T. cruzi* en los estados de Oaxaca y Jalisco, seleccionados por ser de los estados con mayor seroprevalencia en bancos de sangre del país. Los hospitales en donde se realizó el estudio fueron: 1) Hospital General de Oaxaca Zona Centro, 2) Hospital Regional de Pochutla-Oaxaca, 3) Hospital General Dr. Pedro Espinosa Rueda en Pinotepa Nacional, Oaxaca y 4) Hospital Civil de Guadalajara "Fray Antonio Alcalde". Además, se incluyó el Instituto Nacional de Perinatología del Distrito Federal, como control de zona no endémica. El tamaño de la muestra se calculó tomando en cuenta el número de partos atendidos por año para cada hospital y la prevalencia reportada en bancos de sangre. Se incluyeron todas aquellas mujeres gestantes que aceptaron participar firmando una carta de consentimiento informado antes de la recolección de las muestras de sangre; la cual, ha sido aprobada por el Comité de Bioética del Hospital Infantil de México "Federico Gómez".

Datos generales, clínicos y obstétricos de las madres y sus recién nacidos

Durante el trámite de ingreso al hospital, las madres fueron sometidas a un cuestionario para obtener sus datos generales: nombre, edad, dirección, lugar de nacimiento y procedencia. Además, para determinar posibles factores de riesgo se tomó en cuenta la información epidemiológica y obstétrica: conocimiento del vector-transmisor, presencia del vector-transmisor en su domicilio (se tomó en

cuenta la captura intra y peridomiciliar del vector, así como la búsqueda del parásito en heces), número de transfusiones sanguíneas recibidas, número de gestaciones, resolución de los embarazos y semanas de gestación por fecha de última menstruación (FUM). En el cuestionario de los recién nacidos se incluyeron los siguientes datos antropométricos: fecha de nacimiento, sexo, edad por CAPURRO¹³², resolución del embarazo, valoración APGAR¹³³, datos de somatometría (peso, talla y perímetro cefálico) y presencia de alteraciones en hígado, corazón y/o digestivas. A las madres se les comunicó que sus bebés podrían ser re-examinados en un futuro dependiendo del resultado.

Después de la entrevista y antes del parto, se tomaron 5 mL de sangre por punción venosa de la vena media del brazo de la madre y se colocaron en tubos BD Vacutainer para obtener el suero. Durante el parto, después del nacimiento y antes de la expulsión de la placenta, se recogieron 2 mL de sangre del cordón umbilical directamente en tubos Vacutainer K2 EDTA. En el caso de cesáreas, la sangre se tomó al momento de cortar el cordón umbilical.

Búsqueda de mujeres embarazadas reactivas a *T. cruzi*.

Tomando en consideración la recomendación de la OPS/OMS para determinar infección materna por *T. cruzi*, se emplearon dos pruebas serológicas específicas, la Inmunocromatografía, que se realizó con el estuche comercial Chagas Stat-PakTM (Chembio Diagnostic Systems, Inc.) siguiendo las especificaciones del proveedor¹³⁴ y la prueba de ELISA con antígeno total¹³⁵, que se realizó sensibilizando microplacas Costar de 96 pozos (Corning Incorporated) con 100 ng de antígeno total de epimastigotes de *T. cruzi* obtenido de un aislado mexicano en 100 µL de amortiguador de carbohidratos. La placa se incubó con los sueros

problema diluidos 1:250 en PBS-leche al 5%. Después de lavar, se agregó anti-IgG humana conjugada con peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) diluida 1:10,000 en PBS. La reacción se reveló con 50 µL de peróxido de hidrógeno al 30% y 4 mg de o-fenilendiamina y la reacción se detuvo con ácido sulfúrico 4 N. Se determinó la D.O. a 450 nm en un lector de ELISA Olivetti. Se consideraron positivas todas las muestras con valor de densidad óptica mayor al punto de corte determinado por la prueba de ELISA con las mismas condiciones pero utilizando como primer anticuerpo el suero de 30 personas sin antecedentes de la enfermedad de Chagas y negativos a las pruebas serológicas, además de controles positivos y negativos. El punto de corte se calculó tomando en cuenta la media \pm 2 DST.¹³⁶ En los casos de discrepancia entre el resultado de las dos pruebas, se realizó una tercera empleando una ELISA comercial de tercera generación con antígeno recombinante siguiendo el protocolo del proveedor (Accutrack, S.A. de C.V.)¹²⁷

Presencia del DNA del parásito en sangre de cordón umbilical del recién nacido por PCR

El método de PCR fue validado previamente como sigue:

1. Se determinó la temperatura de alineamiento óptima por medio de un gradiente de temperaturas partiendo de 52° hasta 58°C, usando DNA de aislados del parásito y DNA de personas infectadas.
2. Se determinó la sensibilidad de la prueba usando sangre infectada con 1×10^6 parásitos de *T. cruzi*, sangre infectada diluida 1:10, 1:100, 1:1000, y 1:10,000, así como sangre sin infectar.

3. Se determinó la especificidad de la PCR usando los iniciadores Tcz1 y Tcz2, así como iniciadores del gen de la β -actina.

La frecuencia de infección congénita por *T. cruzi* se determinó identificando el DNA del parásito por la técnica de PCR validada. Se emplearon 300 μ l de sangre de cordón umbilical para extraer DNA por el método de fenol-cloroformo¹²⁹. La mezcla de reacción se llevó a un volumen final de 25 μ L con: PCR Master mix 2X (1.5 U Taq ADN polimerasa resuspendida en su amortiguador de reacción a pH 8.5, 10 μ M de cada dNTPs y 75 μ M MgCl₂; Promega), 0.5 μ M de los iniciadores Tcz₁ y Tcz₂, que amplifican una región muy conservada y repetida del nDNA de *T. cruzi*¹¹⁰ y 300 ng del DNA del recién nacido. El programa consta de 35 ciclos de 94°C, 50 segundos, 54°C, 50 segundos y 72°C, 50 segundos, seguido por un paso de extensión final de 72°C, 5 minutos. Se incluyó el DNA de sangre de una persona con serología negativa a la enfermedad de Chagas, como control negativo, DNA de sangre de una persona con Chagas crónico comprobado por serología y DNA de cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* como controles positivos, así como los controles de reactivos (sin DNA). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio 0.5 μ g/mL.

Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en niños con PCR positiva después dos años.

En los niños positivos por PCR, se comprobó la infección por serología después de dos años de nacidos. Se solicitó el permiso de los familiares (padre y/o madre) para tomar una segunda muestra de sangre (5 mL) en tubo con anticoagulante para obtener el suero, en donde se buscó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* por dos pruebas serológicas: ELISA con antígeno total y ELISA recombinante.^{127,}

¹³⁵ Se consideró resultado positivo, al niño con reactividad para ambas pruebas.

Tratamiento.

En la medida de las posibilidades, los niños infectados y reactivos por serología, fueron tratados durante 30 días con Nifurtimox (Lampid) con la dosis recomendada para neonatos e infantes (10-15 mg/Kg/día) en el hospital de origen para ser administrado y monitoreado hasta seroconversión del niño.

Análisis Estadístico

Los datos de la madre fueron analizados con la prueba exacta de Fisher, se relacionó la media (\pm DST) y los porcentajes ($n/N \pm$ IC 95%) con la seropositividad para determinar diferencias estadísticas con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

Los datos antropométricos de los recién nacidos se evaluaron con la prueba de Fisher para determinar la asociación de los parámetros medidos con la infección congénita a *T. cruzi*.¹³⁷ Se calculó la seroprevalencia materna (número de mujeres reactivas a 2 pruebas serológicas/número total de mujeres incluidas) y la frecuencia de la transmisión materno-fetal (número de niños con PCR y serología positiva después de dos años de nacido/el número de recién nacidos de mujeres reactivas a dos pruebas serológicas X 100).

RESULTADOS

Población de estudio.

Con la finalidad de cumplir con el primer objetivo, se estudiaron un total de 1448 mujeres embarazadas y sus recién nacidos que provenían de áreas rurales y urbanas de Oaxaca, Jalisco y el D.F., distribuidas de la siguiente manera: 60 del Hospital General de Oaxaca Zona Centro, 545 del Hospital Regional de Pochutla-Oaxaca, 189 del Hospital General Dr. Pedro Espinosa Rueda en Pinotepa Nacional, Oaxaca, 557 del Hospital Civil de Guadalajara “Fray Antonio Alcalde” y 97 del Instituto Nacional de Perinatología del Distrito Federal. El total de recién nacidos, tomando en cuenta partos gemelares, fue de 1458 (10 gemelos). Los resultados se analizaron por estados y en algunos casos de Oaxaca, se logró la captura intra-domiciliar del vector *Triatoma dimidiata*; sin embargo, no se encontraron parásitos en la materia fecal del vector (Figura 6).

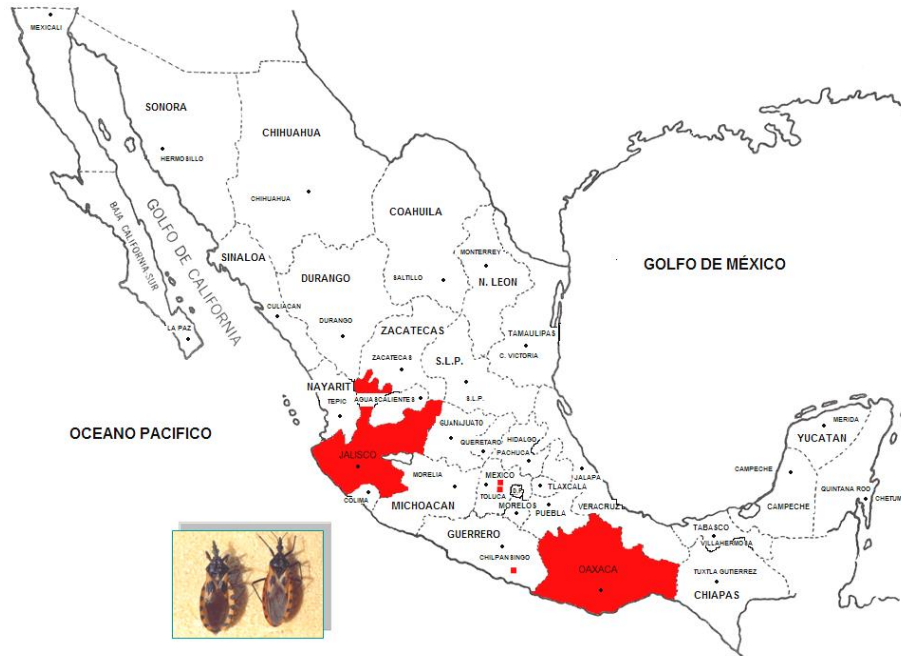


Figura 6. Distribución geográfica de las zonas de estudio.

Datos generales de las madres y sus recién nacidos

El segundo objetivo fue obtener datos gineco-obstétricos de las madres y de somatometría en sus hijos, para determinar posibles factores de riesgo. En la tabla 5, se presenta la relación entre los datos obtenidos de las madres y la seropositividad en los tres estados.

Tabla 5 Datos generales y obstétricos de las mujeres embarazadas positivas y negativas.

PARAMETRO ESTUDIADO	SUBGRUPOS	OAXACA		JALISCO		MÉXICO, D.F.	
		N+ = 35	N- = 759	N+ = 67	N- = 490	N+ = 4	N- = 93
EDAD (AÑOS)	13 – 20	14	260	24	152	1	19
	21 – 30	15	406	29	226	2	25
	31 – 40	6	88	11	106	1	42
	>40	0	5	3	6	0	7
TIEMPO DE RESIDENCIA (AÑOS)	0 – 10	4	165	5	46	0	5
	11 – 20	17	278	26	171	1	23
	21 – 30	12	261	26	203	2	27
	31 – 40	2	53	9	67	1	36
EMBARAZOS	>40	0	2	1	3	0	2
	1	17	314	20	154	2	40
	2	10	185	18	116	1	18
	3	2	116	12	89	1	17
	4	2	66	10	60	0	9
ABORTOS	≥5	4	78	7	70	0	9
	Si	4	72	9	79	1	29
CESAREAS	No	31	687	58	411	3	64
	Si	11	249	32	192	1	24
OBITOS	No	24	510	35	298	3	69
	Si	0	6	0	6	0	5
RPM	No	35	753	67	484	4	88
	Si	9	148	14	159	2	25
EDAD GESTACIONAL	No	26	611	53	331	2	68
	<30	0	7	2	10	0	1
	30.1 – 40	28	612	52	418	3	79
TRANSFUSIONES SANGUINEAS	≥40.1	7	140	13	62	1	13
	Si	0	17	3	14	0	0
	No	35	742	64	476	4	93

+ Seropositiva; - Seronegativa; RPM Ruptura Prematura de Membranas
p> 0.05

Los nueve factores de riesgo estudiados en las mujeres, tales como edad, tiempo de residencia, número de embarazos previos, número de abortos, cesáreas, óbitos, ruptura prematura de membranas, semanas de gestación por fecha de última menstruación y administración previa de hemoderivados, asociados con la serología positiva, no mostraron ser estadísticamente significativos en el aumento de la probabilidad de transmisión. En la tabla 6 se presentan seis de los factores con mayor importancia epidemiológica, sin embargo, el valor de p fue mayor de 0.05 por la prueba exacta de Fisher. El tiempo de residencia fue muy variable en las mujeres seroreactivas, por lo que no resultó ser un factor de riesgo; además, ninguna de ellas ha recibido transfusiones de sangre, por lo que este factor tampoco fue relevante en este estudio (no se incluyen en la tabla).

Tabla 6 Análisis estadístico de los datos ginecológicos del total de las mujeres embarazadas.

ESTADO	EDAD PROMEDIO (años)		PRIMIGESTA (n/N = %)		GESTACIONES ANTERIORES (n/N = %)		ABORTOS ANTERIORES (n/N = %)		OBITOS ANTERIORES (n/N = %)		RPM	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
OAXACA	23.6 ± 6.6	23.9 ± 5.9	48.5	41.3	51.4	58.6	11.4	9.4	0	0.7	25.7	19.4
JALISCO	25.1 ± 7.2	25 ± 6.6	29.8	31.4	70.1	68.5	13.4	14.1	0	1	13.2	32.8
D.F.	27 ± 8.2	29.7 ± 7.9	50	43	50	56.9	25	31.1	0	5.3	26.8	27.9
TOTAL	24.7 ± 7	24.7 ± 6.5	36.7	37.8	63.2	62.1	13.2	13.4	0	12.6	12.8	24.4

RPM: Ruptura Prematura de Membranas

N: Número total de muestras.

n: positivas.

p>0.05 por la prueba exacta de Fisher

Los datos antropométricos afectados durante la infección congénita por *T. cruzi* en el total de los recién nacidos y la asociación con PCR, se presentan en la tabla 7. Se observa que ambos grupos, PCR positivos y negativos a la infección

congénita por *T. cruzi*, presentaron valores que están dentro de límites normales. El análisis estadístico mostró que no hay diferencias significativas en relación a la edad por CAPURRO, peso, y perímetro cefálico. Tampoco se encontraron diferencias en el nacimiento por cesárea, parto y el sexo de los recién nacidos. Aunque los valores de la calificación APGAR al minuto y la talla del recién nacido están por abajo de lo normal, las diferencias no son significativas ($p = 0.37$ y 0.09 respectivamente).

Tabla 7 Datos antropométricos del total de los recién nacidos de Oaxaca y Jalisco.

ESTADO	PCR	CESAREA/ PARTO	SEXO M:F	CAPURRO (Semanas)	PESO (grs)	TALLA (cm)	PERIMETRO CEFALICO (cm)	APGAR 1 min	APGAR 5 min
OAXACA	+	1:6	4:3	39.3 ± 1.6	3082.1 ± 350.8	50 ± 1.4	33 ± 1.7	7.4 ± 1.4	8.8 ± 1.1
	-	6:22	10:18	38.6 ± 2.1	3205.9 ± 608.7	50 ± 2.8	34 ± 2.2	7.7 ± 1	8.8 ± 0.4
JALISCO	+	2:6	7:1	39.1 ± 1.7	3463.7 ± 12.4	54 ± 2.9	35 ± 1.6	7.3 ± 1.1	8.7 ± 1.1
	-	18:41	30:29	38.7 ± 1.7	3078.7 ± 543.9	50 ± 4.4	34 ± 2.7	8.4 ± 0.9	9.2 ± 0.6

Valores normales: CAPURRO 36 semanas, peso 2500-3500 g, talla 45-55 cm, perímetro cefálico 32-36 cm y calificación APGAR normal > de 8.

$p > 0.05$ por la prueba exacta de Fisher

En la tabla 8, se presentan solo los datos antropométricos de los recién nacidos de madres sero-reactivas, PCR positiva y negativa. Todos los datos se encuentran en los rangos normales, a excepción de la calificación APGAR al minuto.

Tabla 8 Análisis estadístico de los datos antropométricos de recién nacidos con PCR positiva de Oaxaca y Jalisco.

PARAMETRO	GRUPOS	OAXACA		JALISCO		MÉXICO, D.F.	
		N+ = 7	N- = 28	N+ = 8	N- = 59	N+ = 0	N- = 4
SEXO	M	4	10	7	30		3
	F	3	18	1	29		1
SDG (X sem)		39.34	38.61	39.15	38.72		35.9
APGAR (min)	1	7.42	7.71	7.37	8.44		8
	5	8.86	8.89	8.75	9.25		9
PESO (g)		3082.14	3205.89	3463.75	3078.74		2977.25
TALLA (cm)		50	50.46	54.12	50.74		49
PERIMETRO CEFÁLICO (cm)		33.5	30.07	35.18	34.18		35.55
ALTERACIONES	HIGADO	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	CORAZÓN	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	DIGESTIVAS	NO	NO	NO	NO	NO	NO

p > 0.05 por la prueba exacta de Fisher

Búsqueda de mujeres embarazadas reactivas a *T. cruzi*.

El tercer objetivo fue determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en el suero de las mujeres estudiadas para determinar la prevalencia de infección por *T. cruzi*, estos resultados se muestran en la tabla 9. Se obtuvo una prevalencia total de 7.32% (106/1448), en el estado de Jalisco (12.02%) significativamente mayor que en Oaxaca (4.4%), y aunque el D.F. no es considerado como una zona endémica, se obtuvo una prevalencia del 4.12%. Estos datos fueron obtenidos por la prueba de ELISA con Ag total y el kit comercial Chagas STAT-PAK, tomando como positivas a todas las mujeres reactivas por dos pruebas, como lo estipula la OPS. Los resultados positivos

fueron confirmados con la prueba de ELISA con Antígeno recombinante. Los resultados discrepantes entre ambas pruebas no fueron tomados en cuenta.

Tabla 9 Seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas de Oaxaca, Jalisco y D.F.

ENTIDAD FEDERATIVA	INSTITUCIÓN	No. DE MUESTRAS	MUJERES REACTIVAS n/N (%)
	Hospital General	60	
OAXACA	Hospital Regional Pochutla	545	35/794 (4.4)
	Hospital General Dr. Pedro Espinosa Rueda	189	
JALISCO	Pinotepa Nacional Hospital Civil Fray Antonio Alcalde	557	67/557 (12.02)
D.F.-	Instituto Nacional de Perinatología	97	4/97 (4.12)
TOTAL		1448	106/1448 (7.32)

N: totales
n: positivas

En la figura 7 se presenta la relación entre la seropositividad a *T. cruzi* por ELISA y la frecuencia del lugar de residencia de las mujeres seropositivas de Oaxaca, y en la figura 8, las de Jalisco. En Perinatología se encontraron cuatro mujeres reactivas a la prueba de ELISA, dos de ellas viven en el Estado de México y dos en el D.F. La gran mayoría viven en áreas rurales con presencia del vector trasmisor, por lo que se infiere que estas mujeres se infectaron por la vía del vector, ya que solo 3/106 (2.83%) recibieron transfusión de sangre.

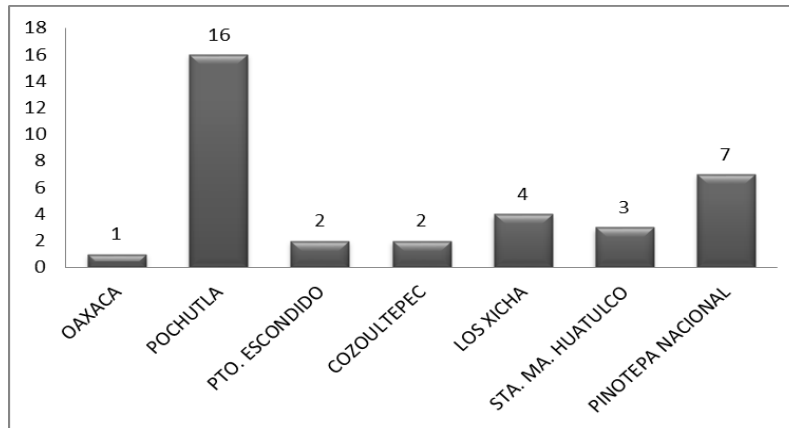


Figura 7 Frecuencia del lugar de residencia en mujeres sero-reactivas de Oaxaca.

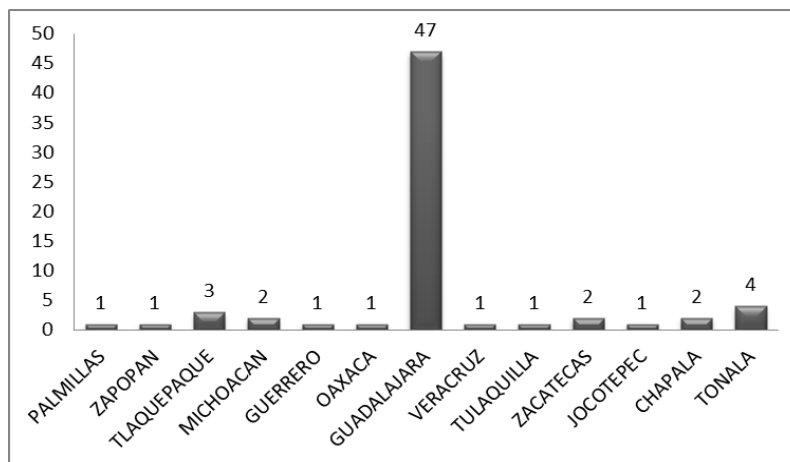


Figura 8 Frecuencia del lugar de residencia en mujeres sero-reactivas de Jalisco.

Presencia del DNA del parásito en sangre de cordón umbilical del recién nacido por la PCR

El cuarto objetivo fue determinar la presencia del parásito en sangre de cordón, usando la técnica de PCR, por lo que fue necesario validar la prueba. Los resultados de esta validación se presentan en las figuras 9 y 10. En la determinación de la temperatura óptima de alineamiento, se observa un amplificado de 200 pb igual en todas las temperaturas del gradiente. Se seleccionó la temperatura de 54°C para el alineamiento de los iniciadores por ser la temperatura en donde se observa mejor el producto de amplificación.

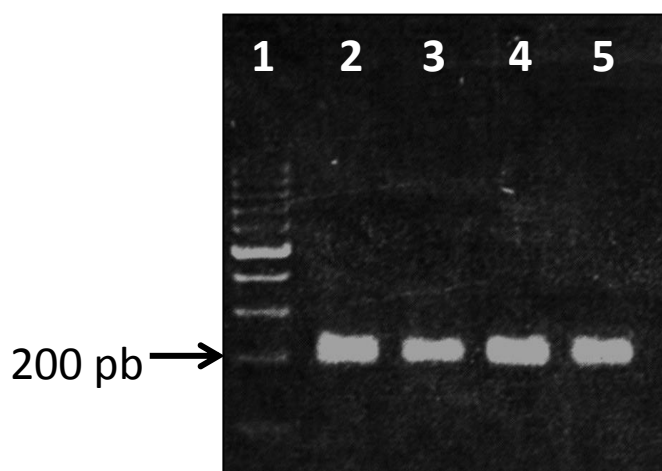


Figura 9 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación obtenidos en un gradiente de temperaturas con los iniciadores Tcz1/Tcz2. Carril 1: Marcador de pesos moleculares. Carril 2: 52°C. Carril 3: 54°C Carril 4: 56°C. Carril 5: 58°C.

En la determinación de la sensibilidad del método, se obtuvo un amplificado de 200 pb hasta la dilución 1:100 de sangre infectada con 1×10^6 epimastigotes de *T. cruzi*, como se observa en la figura 10.

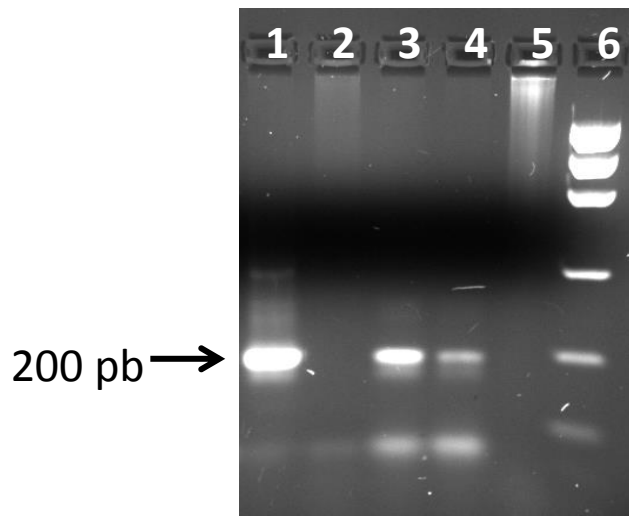


Figura 10 Electroforesis en gel de agarosa al 2% de productos de amplificación obtenidos con sangre infectada a diferentes diluciones usando los iniciadores Tcz1/Tcz2. Carril 1: Sangre infectada con 1×10^6 epimastigotes de *T. cruzi*. Carril 2: Sangre sin infectar. Carril 3: Sangre infectada dilución 1:10. Carril 4: Sangre infectada dilución 1:100. Carril 5: Sangre infectada dilución 1:1000. Carril 6: Marcador de pesos moleculares.

La búsqueda del DNA del parásito por PCR en sangre de los recién nacidos se presenta en la figura 11. Se observó la presencia de la banda de amplificación de 200 pb en 7 de 35 niños del estado de Oaxaca, lo que representa una frecuencia de positivos del 20%, y en 8 de 67 niños en Jalisco que corresponden al 11.94%. En el D.F. ningún recién nacido (4 de 4) fue positivo por PCR.

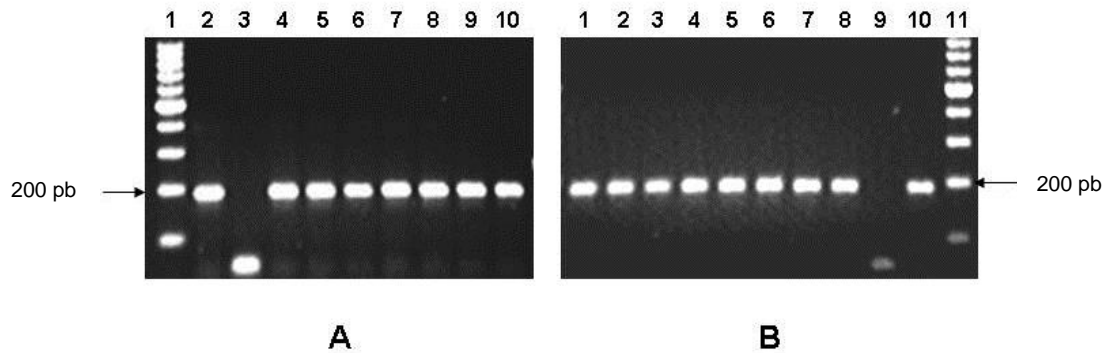


Figura 11 Amplificaciones del DNA extraído de sangre de cordón umbilical de los recién nacidos de madres seroreactivas a *T. cruzi* usando los iniciadores Tcz1/Tcz2. **A**, amplificados obtenidos de recién nacidos en Oaxaca: 1, marcador de pesos moleculares; 2, control positivo; 3, control negativo; 4-10 corresponde al DNA problema. **B**, amplificados obtenidos de recién nacidos en Jalisco: del 1-8 corresponde al DNA problema; 9, control negativo; 10, control positivo; 11, marcador de pesos moleculares.

En la tabla 10 se observan los datos antropométricos de los 15 recién nacidos positivos por PCR. Se observa que todos los datos obtenidos en los recién nacidos están dentro de los valores normales, son semejantes a los obtenidos en los recién nacidos negativos a PCR y no presentaron alteraciones en hígado, corazón o sistema digestivo. Todos resultaron ser asintomáticos para la infección con *T. cruzi*.

Tabla 10. Datos antropométricos de los quince recién nacidos positivos por PCR de Oaxaca y Jalisco.

CASO	SEXO	EDAD GESTACIONAL	EVOLUCIÓN	APGAR		PESO (g)	TALLA (cm)	PERIMETRO CEFÁLICO (cm)	PCR
				1 min	5 min				
OAXACA									
185	M	39	ENFERMO	6	8	3420	50	34	+
344	F	39	SANO	9	9	3000	49	33	+
350	F	38	SANO	8	9	2850	52	34.5	+
406	F	40.4	SANO	5	9	2950	49	31.5	+
569	M	42	SANO	8	9	3500	51	34.5	+
052	M	40	SANO	8	9	3330	51	36	+
076	M	37	SANO	8	9	2525	48	31	+
JALISCO									
190	F	36.4	SANO	6	9	2500	49	33	+
191	M	38.4	SANO	7	9	4140	58	37	+
238	M	40.3	SANO	9	9	3300	51	36	+
255	M	41.2	SANO	9	10	3960	56	37	+
276	M	40.3	SANO	8	9	3790	54	34	+
301	M	40.3	ENFERMO	6	7	3940	57	35	+
372	M	37.1	ENFERMO	7	7	2670	54	33	+
516	M	39.2	SANO	7	10	3410	54	36.5	+

Valores normales: CAPURRO 36 semanas, peso 2500-3500 g, talla 45-55 cm, perímetro cefálico 32-36 cm y calificación APGAR normal > de 8.

ENFERMO: Se refiere a cualquier otra patología diferente a la enfermedad de Chagas

Los resultados de la serología, de las quince madres de los recién nacidos positivos por PCR, se presentan en la tabla 11. Las pacientes fueron identificadas por Inmunocromatografía, solo detectando a las positivas verdaderas, dando como resultado, que la reactividad determinada por las dos técnicas de ELISA fuera la más alta independientemente del tiempo en que se tomo la muestra.

Tabla 11. Serología por dos pruebas en mujeres embarazadas de Oaxaca y Jalisco.

CASO	AL momento de nacer		≥ 2 Años después del parto	
	Inmunocromatografía	ELISA Ag total ^a	Inmunocromatografía	ELISA Ag recombinante ^b
OAXACA				
185	Positivo	1.98	Positivo	0.29
344	Positivo	1.84	N.A.	N.A.
350	Positivo	1.18	Positivo	1.9
406	Positivo	0.802	Positivo	0.29
569	Positivo	1.95	Positivo	0.32
052	Positivo	1.78	N.A.	N.A.
076	Positivo	1.05	Positivo	0.29
JALISCO				
190	Positivo	1.16	Positivo	0.22
191	Positivo	1.25	Positivo	0.28
238	Positivo	1.50	N.A.	N.A.
255	Positivo	1.85	N.A.	N.A.
276	Positivo	1.42	Positivo	0.29
301	Positivo	0.95	Positivo	0.26
372	Positivo	1.77	N.A.	N.A.
516	Positivo	1.50	Positivo	0.26

^a Punto de corte de la ELISA con Ag total: $0.113 + 2(0.027) = 0.167$

^b Punto de corte de la ELISA con Ag recombinante: $0.127 + (0.017) = 0.162$

Determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en niños con PCR positiva después dos años.

El quinto objetivo fue determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los niños positivos a PCR. En la tabla 12 se observan los resultados obtenidos en la serología de los niños positivos por PCR, después de 24 meses de edad, se obtuvieron tres positivos en Oaxaca y dos en Jalisco. La frecuencia de transmisión se sacó tomando en cuenta el número de niños reactivos entre el total de mujeres seroreactivas. En Oaxaca, la frecuencia de transmisión fue de 9.09% (3/33) y en Jalisco fue de 3.07% (2/65).

En las gráficas 1-A y 1-B, se observa la proporción entre la relación de mujeres seroreactivas, el porcentaje de recién nacidos positivos por PCR y la frecuencia de transmisión de *T. cruzi* en los estados de Oaxaca y Jalisco, respectivamente. Los niños positivos por serología después de dos años recibieron el tratamiento específico hasta la seroconversión monitoreada en su hospital de origen. Es importante mencionar que a cuatro niños no se les hizo la prueba después de dos años, debido a que sus tutores no aceptaron continuar en el estudio, por lo que el porcentaje de abandono fue del 3.92% (4/102).

Tabla 12 Serología por dos pruebas en niños positivos a PCR de más de 24 meses de edad de Oaxaca y Jalisco.

CASO	Serología a los 24 meses de edad		ENFERMEDAD DE CHAGAS NEONATAL
	ELISA Ag total ^a	ELISA Ag recombinante ^b	
OAXACA			
185	1.26	2.25	Positivo
344	N.A.	N.A.	N.A.
350	0.091	0.126	Negativo
406	0.056	0.09	Negativo
569	0.909	0.293	Positivo
052	N.A.	N.A.	N.A.
076	0.697	0.245	Positivo
JALISCO			
190	0.058	0.103	Negativo
191	0.065	0.124	Negativo
238	0.074	0.133	Negativo
255	N.A.	N.A.	N.A.
276 ^c	0.060	0.070	Negativo
276 ^d	N.D.	N.D.	Stat-Pak Positivo
301	0.06	0.168	Negativo
372	N.A.	N.A.	N.A.
516	0.824	0.266	Positivo

^a Punto de corte de la ELISA con Ag total: $0.113 + 2(0.027) = 0.167$

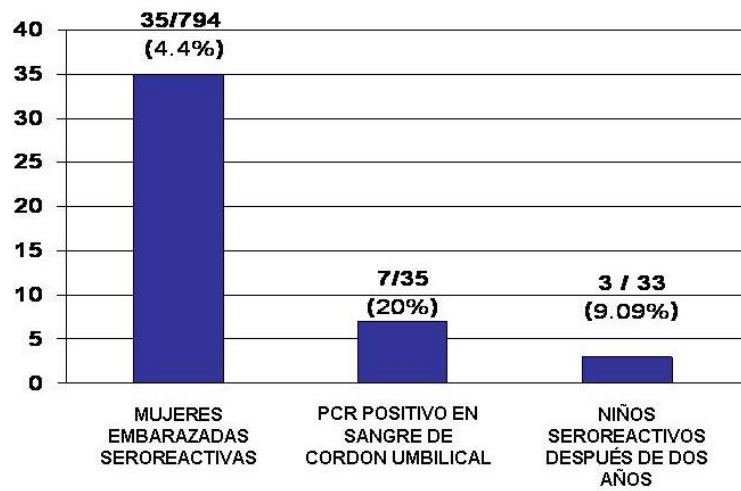
^b Punto de corte de la ELISA con Ag recombinante: $0.127 + (0.017) = 0.162$

^c Niño del estudio

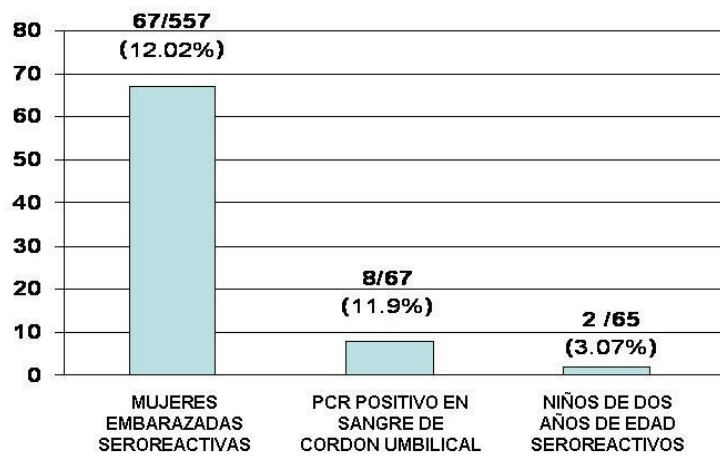
^d Hermana del niño, no incluida en el estudio, hijos de la misma madre.

N.A. No acepto

N.D. No determinado



A



B

Gráfica 1. Seroprevalencia materna, porcentaje de recién nacidos PCR positivos y frecuencia de transmisión de la infección por *T. cruzi*, en los estados de Oaxaca (A) y Jalisco (B). El porcentaje de abandono después de la PCR fue 3.92 % (4/102). Los niños que recibieron tratamiento son los seroreactivos después de dos años.

La descripción de los cinco casos de Chagas congénito encontrados en Oaxaca y Jalisco se presenta a continuación. Aquí se confirma la importancia de detectar a tiempo a todos los niños infectados nacidos de madres seroreactivas, ya que estos en su gran mayoría son asintomáticos y pueden pasar desapercibidos sin que se les administre el tratamiento que les garantice la cura total de la infección, además de representar un riesgo para la transmisión del parásito.

OAXACA

Caso 1.

Mujer de 21 años de edad, originaria de Cozoultepec, Oaxaca, lugar en donde ha radicado toda su vida, acude el 17 de febrero del 2008 al Hospital General de Pochutla, Oaxaca, para ser atendida durante su primer parto. La paciente acepta participar en el estudio firmando una carta de consentimiento y refiere no haber recibido transfusiones sanguíneas a lo largo de su vida. Dio a luz a un recién nacido de 39 semanas de gestación por parto normal, quien durante el examen físico, obtuvo una calificación APGAR de 6 al minuto y 8 a los 5 minutos (Normal > 8). Al momento del nacimiento, peso 3,420 gramos (Normal: 2500 a 3500 grs.), midió 50 cm (Normal: 45 – 55 cm) y su perímetro cefálico fue de 34 cm (Normal: 32 – 36 cm). No presento alteraciones en hígado, corazón y sistema digestivo. En la búsqueda de anticuerpos en el suero materno, se obtuvo un resultado positivo a la prueba de Stat-pak, el título de anticuerpos por la prueba de ELISA con antígeno total fue de 1.98 y con antígeno recombinante fue de 0.29, los dos resultados por arriba del punto de corte.^{127, 138} En la búsqueda del parásito por PCR en sangre de cordón umbilical al momento de nacimiento, se obtuvo un producto de amplificación de 200 pb con iniciadores Tcz1 y Tcz2, específicos de *T. cruzi*.¹¹⁰ El resultado de la prueba de PCR fue confirmado con serología después de 24 meses de nacido, se determinó la presencia de anticuerpos propios del niño por la prueba de ELISA y se obtuvo un título de 1.26 con antígeno total y 2.25 con antígeno recombinante. Se administró el tratamiento

específico durante 30 días: una tableta de Nifurtimox (Lampid) de 40 mg/kg de peso, hasta la seroconversión determinada en su hospital de origen.²⁶

Caso 2.

Mujer de 21 años de edad, que radica en Santa María Huatulco, Oaxaca, acude el 19 de abril del 2008 al Hospital General de Pochutla, Oaxaca, para ser atendida durante su segundo parto. La paciente acepta participar en el estudio firmando una carta de consentimiento y refiere no haber recibido transfusiones sanguíneas a lo largo de su vida. Dio a luz a un recién nacido del sexo masculino, de 42 semanas de gestación por CAPURRO. En el examen físico, realizado al momento del nacimiento, obtuvo 8 en la calificación APGAR al minuto y 9 a los cinco minutos, pesó 3,500 grs, midió 51 cm y el perímetro cefálico fue de 34.5 cm. Además, no presento alteraciones en hígado, corazón y sistema digestivo. En la búsqueda de anticuerpos en el suero materno, se obtuvo un resultado positivo a la prueba de Stat-pak, el título de anticuerpos por la prueba de ELISA con antígeno total fue de 1.95 y en la ELISA con antígeno recombinante de 0.320.^{127, 138} La búsqueda del parásito por PCR, en sangre de cordón del recién nacido, mostró un amplificado de 200 pb específico de *T cruzi*.¹¹⁰ Para demostrar la infección en él bebé, se determinó la presencia de anticuerpos propios del niño con la técnica de ELISA. Se obtuvo un título de 0.909 con antígeno total y de 0.293 con antígeno recombinante. Se administró Nifurtimox por 30 días hasta observar seroconversión, la determinación se realizó en su hospital de origen. La mamá no recibió el tratamiento anti-*T. cruzi*.²⁶

Caso 3.

Mujer primigesta de 17 años de edad, originaria del Municipio de Mechoaca, Oaxaca, lugar en donde ha radicado toda su vida. Acudió al Hospital General Dr. Pedro Espinoza en Pinotepa Nacional, Oaxaca, el día 13 de mayo del 2008 para ser atendida durante el parto. Dio a luz a un recién nacido vivo sano, de sexo masculino, de 37 semanas de gestación, quien después del examen físico obtuvo una calificación APGAR de 8 al minuto y 9 a los cinco minutos, peso 2,525 grs, y talla de 48 cm; su perímetro cefálico fue de 31 cm y no tuvo ninguna alteración en

corazón, hígado y sistema digestivo. Previo al parto, se le informó sobre la enfermedad de Chagas y el riesgo de transmitir la infección al bebé a través de placenta, por lo que aceptó firmando una carta de consentimiento para que se le realizara la prueba serológica Tamiz resultando positiva. Posteriormente, se determinó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en suero mediante la técnica de ELISA con antígeno total y con antígeno recombinante, obteniendo un título de 1.055 y 0.293 respectivamente.^{127, 138} En el recién nacido, se buscó la presencia del parásito por PCR, mostrando una banda de amplificación de 200 pb con los iniciadores Tcz1 y Tcz2 específicos de *T. cruzi*.¹¹⁰ Las pruebas serológicas para buscar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* a los 24 meses de vida del bebé, presentaron títulos de 0.697 con antígeno total y 0.245 con antígeno recombinante. Se determinó que ambos eran positivos a la enfermedad de Chagas y se prosiguió a enviar el tratamiento específico (Nifurtimox por 30 días) para él bebé, quien fue monitoreado en su hospital de origen hasta la seroconversión. La mamá, no recibió tratamiento.²⁶

JALISCO

Caso 1.

Mujer de 17 años de edad, nativa de Guadalajara, Jalisco. Acudió al Hospital Civil Fray Antonio Alcalde en Guadalajara, el 17 de abril del 2007 para ser atendida de un segundo embarazo de 39 semanas con ruptura prematura de membranas. La resolución del embarazo fue por parto normal, dando a luz a un recién nacido de sexo masculino, de 40.3 semanas de gestación obtenido por CAPURRO. En la exploración física obtuvo una calificación APGAR de 8 al minuto y 9 a los cinco minutos, pesó al nacer de 3,790 grs, talla 54 cm, perímetro cefálico 34 cm y no presento alteraciones en Hígado, Corazón o Sistema Digestivo. Al momento del parto, se realizó serología anti-*T. cruzi* en el suero de la mamá. Fue reactiva a la prueba tamiz Chagas Stat-Pak y con la técnica de ELISA presentó un título de anticuerpos de 1.422 con antígeno total y 0.297 con antígeno recombinante.^{127, 138} Se buscó la presencia del parásito por PCR en sangre del cordón umbilical, de la cual, se obtuvo un producto de amplificación de 200 pb específico de *T. cruzi*.¹¹⁰

Pasado 24 meses se determinó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* presentes en el suero del bebé, encontrando un título de 0.060 por ELISA con antígeno total y 0.070 con antígeno recombinante.^{127, 138} Estos resultados indican que no hubo transmisión ya que el bebé no presentó signos ni síntomas específicos de la infección con el parásito. Sin embargo, la madre solicitó que se hicieran las pruebas a sus otros dos hijos, ya que al momento de la segunda toma de muestra, ella ya tenía un tercer parto, del cual nació una niña. Se realizó la prueba rápida en sus tres hijos y la más pequeña fue positiva por Stat-pak. Ninguno de sus hijos presentó signos o síntomas específicos de la infección con *T. cruzi*. La niña positiva por serología, fue sometida al tratamiento con Nifurtimox y el seguimiento fue realizado en su Hospital de origen hasta la seroconversión.²⁶

Caso 2.

Mujer de 25 años de edad, con 19 años de residencia en Zacatecas, se presenta en el Hospital Civil Fray Antonio Alcalde, en Guadalajara, el 27 de septiembre del 2007 para ser atendida de su tercer embarazo de 41 semanas de gestación determinado por FUM. La resolución de sus embarazos anteriores fue por cesárea y nunca ha recibido transfusiones sanguíneas. En el parto, dio a luz a un recién nacido vivo sano, de sexo masculino, con 39.2 SDG por CAPURRO, calificación APGAR de 7 al minuto y de 10 a los cinco minutos, peso 3,410 grs, talla 54 cm, perímetro cefálico 36.5 cm y no presentó alteraciones en hígado, corazón o sistema digestivo. Al momento del parto, se realizaron las pruebas serológicas con previa autorización, para la búsqueda de anticuerpos anti-*T. cruzi* por Stat-pak, ELISA con antígeno total y ELISA con antígeno recombinante. Los resultados que se obtuvieron indican que la señora tiene anticuerpos contra el parásito y los títulos obtenidos por las pruebas de ELISA son 1.507 y 0.265 respectivamente.^{127, 138} Se buscó la presencia del parásito en sangre de cordón umbilical por la prueba de PCR para determinar la infección en el recién nacido. Se obtuvo un producto de amplificación de 200 pb específico de *T. cruzi*.¹¹⁰ Después de 24 meses de nacido, se determinó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero del bebé y el título obtenido fue 0.824 y 0.266 con la prueba de

ELISA con antígeno total y recombinante, respectivamente. Se administró el tratamiento específico hasta la seroconversión determinada en su hospital de origen.²⁶

DISCUSIÓN

La transmisión materno-fetal de *T. cruzi* puede tener consecuencias severas en el desarrollo y supervivencia del feto, produciendo la forma severa de la infección crónica en la etapa adulta del niño no tratado. Actualmente, la infección congénita de *T. cruzi* se presenta en áreas endémicas y no endémicas de la enfermedad. Es considerada como un problema de salud pública, debido a la presencia de recién nacidos asintomáticos que están infectados y que no son detectados a tiempo, a causa de la falta de estrategias de prevención y control. Los resultados obtenidos en este estudio contribuyen al conocimiento de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* en zonas endémicas de México; ya que se tienen pocos estudios. En 1998, se reportó el primer caso confirmado de una niña recién nacida del estado de Michoacán, y hasta el 2005 y 2008, se reportan datos de seroprevalencia en mujeres embarazadas pero ningún caso de transmisión.^{42, 43} A pesar de que existen varios grupos de trabajo dedicados al estudio de la enfermedad de Chagas, no se tienen reportes de la transmisión materno-fetal en el país, tal vez porque intervienen varios factores como las alteraciones en la placenta, el genotipo del parásito y la inmunidad de la madre, quien participa en la capacidad de respuesta del feto frente al parásito.¹³⁹

En este estudio, se determinó la prevalencia de mujeres embarazadas seroreactivas a *T. cruzi*, así como la frecuencia de transmisión del parásito a sus recién nacidos en los estados de Oaxaca y Jalisco como zonas endémicas y el D.F. considerado zona no endémica. El resultado de la seroprevalencia total en mujeres embarazadas fue de 7.32%, mayor al 4.1% obtenido en un grupo de 145 mujeres embarazadas de Poza Rica-Veracruz y Palenque-Chiapas;⁴³ es probable

que esta diferencia se debe a la población de mujeres estudiadas y a las características de la zona geográfica en donde se llevó a cabo el estudio.

Al comparar los resultados de la población de mujeres embarazadas en tres zonas geográficas (4.4% en Oaxaca, 12.02% en Jalisco y 4.12% en el D.F.) con los valores reportados en población abierta (4.5% al 17.7% en Oaxaca y 0.1% al 12.11% en Jalisco), se observan resultados semejantes, aunque no se trate del mismo tipo de población.⁴⁸ Algunos autores mencionan que la variación en los resultados entre regiones geográficas, se debe al uso de diferentes métodos de diagnóstico. Sin embargo, en este trabajo se realizó la búsqueda con el mismo procedimiento metodológico y se obtuvieron resultados diferentes; es probable dicha variación puede ser causada por la virulencia de la cepa de *T. cruzi* de cada región, además de las diferencias inmunológicas, genéticas y nutricionales de las madres.

Las diferencias observadas en la prevalencia entre Oaxaca y Jalisco, indican que los factores de riesgo en estos dos estados son diferentes. En las zonas rurales de Pochutla y Pinotepa Nacional en Oaxaca, se realizan constantemente campañas de fumigación contra los mosquitos causantes de la Malaria y el Dengue, a diferencia de las localidades estudiadas en Jalisco, que se encuentran ubicadas en áreas urbanizadas con mejores condiciones habitacionales y en donde no se realizan este tipo de fumigaciones; probablemente el fertilizante este teniendo algún efecto sobre la virulencia del vector.

La prevalencia en el D.F. puede deberse a las características propias de las pacientes que asisten al Instituto Nacional de Perinatología (INPer), ya que es un hospital de concentración que recibe a la población que viene de la región centro

y sureste del país, se incluyen estados que son considerados endémicos con presencia del vector. En México, existen 32 especies de vectores de mayor importancia epidemiológica, dispersos en toda la República, con mayor presencia en los estados con climas tropicales, en donde el mecanismo principal es a través del vector. Sin embargo, la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* está cobrando mayor importancia, ya que una gran población de mujeres infectadas en edad gestacional se encuentran en la fase crónica de la enfermedad lo que representa un riesgo repetido en embarazos subsecuentes, así como la posibilidad de transmisión de una generación a otra. Las mujeres embarazadas incluidas en el estudio, provienen de regiones donde las características epidemiológicas de la transmisión vectorial son muy diferentes y están relacionadas con la presencia intra-domiciliar del vector, lo que probablemente se refleja en las diferencias seroepidemiológicas.

En relación a la amplificación del DNA de *T. cruzi* por PCR en sangre de cordón umbilical, se muestra que el porcentaje de PCR positivos es muy alto en los dos estados, en Oaxaca es dos veces mayor que en Jalisco, la probable explicación a estos resultados, es que la madre puede transmitir al feto a través de sangre, parásitos vivos, parásitos muertos, DNA del parásito y/o moléculas liberadas del parásito, que se pueden identificar en la sangre fetal. Como ya se mencionó, la placenta juega un papel muy importante en la transmisión, existen varias rutas por las cuales el parásito invade placenta y se lleva a cabo la transmisión materno-fetal. Por ejemplo, a través de la ruta hematogena, por la invasión de las vellosidades de los trofoblastos, invasión por zona marginal, invasión por lesiones en la placenta o a través del fluido amniótico. En estas rutas, el parásito infecta al

feto cuando cruza la barrera trofoblástica o cuando cruza por la zona donde disminuye la barrera trofoblástica antes de penetrar el tejido mesenquimal.¹⁴⁰ Es por ello que una PCR positiva no significa que el recién nacido este infectado y mucho menos que desarrolle la enfermedad, por tal motivo, se debe demostrar la infección en los niños positivos a PCR por la presencia de anticuerpos propios del bebé específicos contra *T. cruzi*, después de al menos 9 meses de nacido, porque estos anticuerpos ya no serán de la madre sino del propio sistema inmune del niño.¹⁴¹ Por estas razones, la PCR aún no ha sido validada para el diagnóstico de la infección congénita durante la identificación temprana de recién nacidos infectados y solo se utiliza en investigación especializada.

En relación a los resultados de transmisión materna, el estado de Oaxaca presentó un valor tres veces mayor (9.09%) que la obtenida en el estado de Jalisco (3.07%). Como no se tienen reportes previos en México, se puede comparar con lo publicado en países de Sudamérica, por ejemplo, en Bolivia, recientemente se han publicado valores que van del 1% en una región hasta 12% en otras zonas del mismo país.⁸⁰ Las diferencias entre los valores de la frecuencia de transmisión pueden deberse a varios factores, como las áreas estudiadas, la carga parasitaria en la madre y probablemente el tipo de cepas mexicanas de *T. cruzi*; ya que en México predomina el genotipo I de *T. cruzi* y estas puedan tener menor virulencia o tropismo por la placenta y el cordón umbilical,¹⁴² contrario a lo que se ha visto en Bolivia y Argentina, en donde la mayoría de casos de transmisión vertical son por el genotipo Tc IId.¹⁴³

Los resultados muestran que en el estado de Oaxaca la seroprevalencia materna fue menor y la frecuencia de transmisión mayor que en Jalisco, una probable

explicación puede deberse a la presencia del vector *T. dimidiata*, ya que esta asociado con mayores índices de infección pero bajos niveles de seroprevalencia humana,¹⁴⁴ como se ha descrito en Ecuador. Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que los niños con serología positiva después de dos años no presentaron alteraciones antropométricas, fueron asintomáticos, probablemente la falta de síntomas este asociado con la especie de triatomino presente en las áreas geográficas estudiadas de México. En Bolivia, Brasil, Chile y Uruguay, los casos sintomáticos más graves de transmisión congénita, están asociados con la presencia del vector *Triatoma infestans*, el cual, no se encuentra en México; es posible que esta sea la razón de porque existen pocos casos en nuestro país y además, los que se logran detectar son asintomáticos.¹⁴⁵

Los resultados obtenidos en las madres y en los recién nacidos fueron corroborados por dos pruebas serológicas específicas como lo define la OMS para la confirmación del diagnóstico,¹⁴⁶ por lo que se considera como transmisión congénita de *T. cruzi*, cuando un neonato nace de una madre infectada con serología positiva o parásitos de *T. cruzi* presentes en sangre y que en el recién nacido se identifiquen parásitos al momento del nacimiento o anticuerpos específicos que no son de origen materno descartando que la infección haya sido adquirida por vector o transfusión sanguínea.²⁸

Por lo que respecta a la asociación entre factores de riesgo que pueden influir en la transmisión materno-fetal no se encontró relación entre la seropositividad materna y tales factores, como se muestra en las publicaciones de Bolivia y Chile, en donde encontraron que la infección materna crónica por *T. cruzi* parece no

tener ninguna influencia clínica, durante el curso del embarazo, ni en el producto, comparando madres infectadas y no infectadas.¹³⁸

El análisis estadístico de los parámetros antropométricos en los recién nacido con PCR positiva y serología positiva, no mostró diferencias significativas (valor de $p > 0.05$), esto indica que en este estudio no se encontró asociación entre la infección congénita por *T. cruzi* y la sintomatología específica. En los casos en donde la condición física del recién nacido fue menor, la causa no fue la infección con *T. cruzi*, es probable que las condiciones de malnutrición, los desordenes metabólicos e inmunológicos en la madre afectaron al bebé. A pesar de ello, cinco niños con PCR positiva presentaron serología positiva después de dos años, lo que indica que sí hubo transmisión materno-fetal. Un estudio realizado en mujeres embarazadas portadoras de la infección que transmitieron la infección a sus bebés por la vía trans-placentaria, reportó que el peso bajo al nacer y la calificación APGAR tienen un valor predictivo positivo bajo, por lo que sugieren que la enfermedad debe diagnosticarse por métodos serológicos.¹³⁸ En este trabajo, El APGAR fue relativamente más bajo en los niños positivos que en los negativos, sin llegar a ser un factor indicativo de transmisión.

Aunque en algunos casos congénitos se pueden observar síntomas no específicos de la enfermedad de Chagas, todos los casos encontrados en este estudio son asintomáticos. Esto justifica la necesidad de implementar estrategias de control para la búsqueda obligatoria de la infección congénita basada en el diagnóstico de laboratorio.

Los casos de infección congénita encontrados se encuentran en estadio agudo de la infección, por lo que pueden ser tratados con el fármaco específico, el cual

debe ser administrado tan pronto como el diagnóstico sea confirmado. Durante el embarazo no es recomendable la administración del tratamiento, ya que el riesgo teratogénico es muy alto y los efectos adversos no se conocen.

Para disminuir la frecuencia de transmisión es necesario establecer programas de prevención de la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* en todos los centros de atención primaria y hospitalaria de áreas endémicas y no endémicas, con la finalidad de identificar mujeres infectadas para administrar el tratamiento a todas aquellas mujeres menores de quince años y aquellas en edad reproductiva que no estén embarazadas o lactando. También es necesario educar a la población sobre el conocimiento de la enfermedad de Chagas y sus mecanismos de transmisión, para reducir el riesgo de infección por vector en bancos de sangre y a través de mujeres infectadas asintomáticas que funcionen como reservorios.

Aunque la transmisión congénita de *T. cruzi* depende de varios factores (área geográfica, el vector, genotipo del parásito, la respuesta inmune de la madre y el neonato y la fisiología de la placenta) es importante identificar oportunamente a las madres infectadas y sus recién nacidos infectados asintomáticos, ya que todas las mujeres en edad reproductiva pueden o no transmitir al parásito en todos sus embarazos así como la posibilidad de transmitir de una generación a otra ocasionando que el riesgo de transmisión sea a largo plazo.

El presente estudio realizado en tres Hospitales de Oaxaca y uno de Jalisco, ha demostrado la importancia de implementar el diagnóstico prenatal en los servicios de ginecología y obstetricia en Instituciones de salud del país, en donde aún no hay normas establecidas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas Congénita. Las mujeres embarazadas infectadas y los recién nacidos infectados

son asintomáticos y representan un riesgo potencial en la transmisión por difundir en un 7.32% la enfermedad de Chagas Congénita. El tratamiento, no es recomendado durante el embarazo por los efectos adversos, después del parto, las mujeres infectadas pueden ser monitoreadas con electrocardiogramas regulares y evaluaciones clínicas; y ya que el tratamiento no es útil en fase crónica, solo se administra al recién nacido infectado que va progresar favorablemente hasta la cura total. Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren la necesidad de crear programas de control y prevención en la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* en nuestro país, ya que la migración de personas de áreas endémicas a zonas industrializadas en busca de trabajo, va en aumento ocasionando que la prevalencia de la infección sea un problema de salud en zonas no endémicas, como es el caso de la Ciudad de México.

Para identificar en tiempo y forma a mujeres embarazadas infectadas y a sus recién nacidos, se sugiere lo siguiente:

1. Establecer en todos los centros de salud, hospitales generales y de maternidad, la búsqueda de mujeres embarazadas reactivas a *T. cruzi*, desde su primer cita pre-natal.
2. Realizar el monitoreo fetal por ultrasonido.
3. Establecer el diagnóstico parasitológico del recién nacido empleando pruebas moleculares, como la PCR de sangre propia del bebé y obtenida al nacimiento, además, pruebas serológicas después de 8 meses de nacido.
4. Proporcionar el tratamiento a los bebés positivos hasta comprobar la seroconversión.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

- El estudio de mujeres embarazadas con más de 32 semanas de gestación, permitió identificar a las mujeres seroreactivas a *T. cruzi* que pueden transmitir el parásito por la vía materno-fetal.
- El uso de historias clínicas que incluyen datos generales, epidemiológicos, obstétricos y de somatometría, permitieron determinar que parámetro es un factor de riesgo para adquirir la infección y que todos los niños seropositivos fueron asintomáticos.
- La búsqueda de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero con las pruebas Chagas Stat-Pak y ELISA, mostraron ser una extrategía aplicable al laboratorio clínico, permitiendo la identificación adecuada de las mujeres embarazadas infectadas con el parásito y el seguimiento del recién nacido.
- La técnica de PCR identificó la presencia del DNA del parásito en la sangre de cordón umbilical; sin embargo, el resultado no confirma la infección con *T.cruzi* en el recién nacido, ya que existe la posibilidad de que el niño no se infecte. Es necesario complementar el resultado con otro método directo o con pruebas serológicas después de un año.
- La determinación de anticuerpos anti-*T. cruzi* en los niños nacidos de madres seroreactivas después de 2 años, demostró la presencia de infección con el parásito, mostrando que existió transmisión materno-fetal. El diagnóstico correcto permitió que el tratamiento específico fuera administrado a tiempo logrando la seroconversión del niño.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chagas C. 1909. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi* n. Gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida de homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1: 159-218.
2. WHO. 2002. Control of Chagas disease. WHO Tech Rep Series 905. Geneva, Switzerland: WHO.
3. WHO. 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas em las Américas. In: OPS/HDM/CD/425-06.
4. Schmunis G. 2007. The globalización of Chagas disease. ISBT Science Series 2:6-11.
5. OPS–Fundación Mundo Sano. 2007. La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral. OPS/CD/426-06.
6. Schmunis G.A. 2004. Southern Cono initiative. En: Schofield C, Ponce C. (eds.). Proceedings of the second international workshop on population genetics and control of triatominae 26-31.
7. Cuba C.A., Abad F.F., Roldan R.J., Vargas V.F., Pollack V.L., Miles M.A. 2002. The triatomines of northern Peru with emphasis on the ecology and infection by trypanosomes of *Rhodnius ecuadoriensis* (Triatominae). Mem Inst Oswaldo Cruz. 97:175-183.
8. Dumonteil E., Ruiz P.H., Rodriguez F.E., Barrera P.M., Ramirez S.M.J., Rabinovich J.E. 2004. Re-infestation of houses by *Triatoma dimidiata* after

- intradomicile insecticide application in the Yucatan Pininsula, Mexico. Mem Inst Oswaldo Cruz. 99:253-266.
9. TDR/OMS 20. 2005. Programa especial de investigación y enseñanza sobre Enfermedades Tropicales (TDR).
 10. Paredes A.E., Valdez M.J., Torres N.B. 2001. Vectorial importance of triatominae bugs in Guaymas Mexico. Rev Lat Microbiol. 43:119-122.
 11. Escamilla G.G., Martínez G.M.N., Riverón N.L., Aguilar E.D.V., Bravo L.A., Cob S.C., Ponce M.M. 2012. *Trypanosoma cruzi*: seroprevalence detected in the blood bank of the Instituto Nacional de Pediatría, México city, in the period 2004 through 2009. Transfusion. 52:595-600.
 12. Gamboa L.R., Gonzalez R.C., Padilla R.N., Sosa E.S., Caamal K.A., Buekens P., Dumonteil E. 2011. Do commercial serologic tests for *Trypanosoma cruzi* infection detect Mexican strains in women and newborns? J Parasitol. 97:338-343.
 13. Bittencourt A.L., Sadigursky M., Da Silva A.A., Menezes C.A., Marianetti M.M., Guerra S.C., Sherlock I. 1988. Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. Mem Inst Oswaldo Cruz. 83:37-39.
 14. www.dpd.cdc.gov/dpdx
 15. Martínez I.J.A., Grant G.Y., Morales C.Z.Y., Haro R.S., Ventura R.L.V., Noguera T.B., Bustos S.R. 2008 Importance of species of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) in risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* in western México. J Med Entomol. 45:476-482.
 16. Hernández A.D.A. 2008. Epidemiología (Cuarta parte). Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. 43:1-4.

17. Arce F.M., Ramos L.A., Lopez M.A., Salgado J.B., Talamás R.P., Rosales E.J.L. 2011. A DNA vaccine encoding for TcSSP4 induces protection against acute and chronic infection in experimental Chagas disease. *Int J Biol Sci.* 7:1230-1238.
18. Guerri G.R.A., Di Girolamo C., Ciannameo A., Milei J. 2009. Migration flow and imported diseases: chronic chagasic cardiomyopathy. *G Ital Cardiol (Rome).* 10:234-240.
19. Báez A., Lo Presti M.S., Rivarola H.W., Montesana G.G., Pons P., Fretes R., Paglini O.P. 2011. Mitochondrial involvement in chronic chagasic cardiomyopathy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105:239-246.
20. Martinez de T.B., Jackson Y., Paccolat C., Irion O. 2009. Congenital Chagas disease in Geneva: diagnostic and clinical aspects. *Rev Med Suisse.* 5:2091-2092.
21. Santos L.S., Torres R.M., Machado A.G.F., Bahia M.T., Martins H.R., Teixeira C.A., Coelho R.J.G., Albajar V.P., Martins F.O.A., Lana M. 2012. In house ELISA method to analyze anti-*Trypanosoma cruzi* IgG reactivity for differential diagnosis and evaluation of Chagas disease morbidity. *Rev Soc Bras Med Trop.* 45:35-44.
22. Riera C., Verges M., Iniesta L., Fisa R., Gállego M., Tebar S., Portús M. 2012. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg.* 86:412-416.

23. De Souza R.M., Amato N.V., Bezzerra R.C., Gakyia E., Braz L.M. 2012. Evaluation of the Symbiosys immunoassay for the serological diagnosis of Chagas disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 54:115-116.
24. Cura E., Wendel S. 1994. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. Washington D.C. U.S.A.: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional 61.
25. Fuentes B.R., Maturana A.M., de la Cruz M.R. 2012. Efficacy of nifurtimox for the treatment of chronic Chagas disease. *Rev Chilena Infectol*. 29:82-86.
26. Sosa E.S., Colantonio L., Segura E.L. 2012. Therapy of Chagas disease: implications for levels of prevention. *J Trop Med*. 2012:292138.
27. Cusnalter M.C., Gómez R.D., Amat L.I., Aguiló F., Henández A., Laila J.M. 2004. Chagas congénito, ¿Es posible en España?. *Ginecología y Obstetricia Clínica*. 5:198-203.
28. Carlier Y., Torrico F. 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras of Med Trop*. 36:767-771.
29. Chagas C. 1911. Nova entidade morbida do homen. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 3:219-275.
30. Apt W., Naquira C., Strozzi L. 1968. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*. In mice with acute and chronic infection. *Bol Chil Parasitol* . 23(1):15-19.

31. Nattan L.L. 1921. Hérité des infections expérimentales a *Schizotrypanum cruzi*. Bulletin de la société de Pathologie exotique. 14:232-238.
32. Dao L. 1949. Otros casos de la enfermedad de Chagas en el estado de Guarico (Venezuela): formas agudas y crónicas; observación sobre la enfermedad de Chagas congénita. Rev policlínica de Caracas. 17:17-32.
33. Jörg M. 1953. Tripanosomiasis congénita mortal en un lactante de 17 días. Primera Conferencia Nacional de Enfermedad de Chagas. 205.
34. Romaña C. 1963. Enfermedad de Chagas. Lopez Libreros Ed. Buenos Aires.
35. Howard J., Rubio M. 1968 Congenital Chagas' disease. I. Clinical and epidemiological study of 30 cases. Bol Chil Parasitol. 23:107-112.
36. Rezende J. 1959. Placentite chagásica. Un caso provavel de transmissao placentaria de esquizotripanose humana. Rev Ginecol Obstet. 105:9.
37. Bittencourt A.L. 1960. Sobre a forma congénita de doenca de Chagas. Estudo anatomopatologico de 6 casos. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2:319.
38. Azogue E., La Fuente C., Darras C. 1985. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. Trans R Soc Trop Med Hyg. 79:176-180.
39. Russomando G., de Tomassone M.M., de Guillen I., Acosta N., Vera N., Almiron M., Candia N., Calcena M.F., Figueredo A. 1998. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the Polimerase Chain Reaction. Am J Trop Med Hyg. 59:487-491.

40. Mendoza T.C.A., Cordova B.E., Ancca J.J., Saldana D.J., Torres C.A., Velasquez T.R. 2005. The prevalence of Chagas disease in puerperal women and congenital transmission in an endemic area of Peru. *Rev Panam Salud Publica*. 17:147-153.
41. Sosa E.S., Gamboa L.M.R., Cid L.J., Althabe F., Alger J., Almendares O., Cafferata M.L., Chippaux J.P., Dumonteil E., Gibbons L., Padilla R.N., Schneider D., Belizan J.M., Buekens P. 2008. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras and México. *Am J Trop Med Hyg*. 79:755-759.
42. Guzman B.C., Lahuerta S., Velasco C.O. 1998. Chagas disease. First congenital case report. *Arch Med Res*. 29:195-196.
43. Olivera M.A., Guillen O.F., Cruz V.S., Hernández B.N., Perez G.E., Cordova C.G. 2006. Serological and parasitological screening of *Trypanosoma cruzi* infection in mothers and newborns living in two Chagasic areas of México. *Arch Med Res*. 37:774-777.
44. Moya P., Moretti E. 1997. Doença de Chagas congénita. En clínica e Terapéutica da Doença de Chagas. Pinto Días JC e Rodrigues Coura J. Editora Fiocruz.
45. Moya P., Basso B., Moretti E. 2005. Congenital Chagas disease in Cordoba, Argentina: epidemiological, clinical, diagnostic and therapeutic aspects. Experience of 30 years of follow up. *Rev Soc Bras Med Trop*. 38: Suppl 233-40.

46. Dias J.C.P. 2005. Enfermedad de Chagas en las Américas: epidemiología y control. *Enf Emerg.* 8:10-17.
47. Moncayo A. 2003. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98:577-91.
48. Cruz R.A., Pickering L.J.M. 2006. Chagas disease in México: an analysis of geographical distribution during the past 76 years –a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 101:345-354.
49. Altchech J., Biancardi M., Lapena A., Ballering G., Freilij H. 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños, Ricardo Gutierrez, Buenos Aires, Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38:Suppl 2, 41-45.
50. Torrico F., Alonso V.C., Billot C., Truyens C., Carlier Y. 2007. Relaciones materno fetales en la infección con *T. cruzi* y la implementación de un programa nacional de detección y tratamiento de Chagas congénito en Bolivia. *Enf Emerg.* 9:9-16.
51. Muñoz J., Portus M., Corachan M., Fumado V., Gascon J. 2007 Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic área. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 101:1161-1162.
52. Sanchez N.O., Mora M.C., Basombrio M.A. 2005. High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics.* 115:668-672.
53. Duaso J., Yanez E., Castillo Ch., Galanti N., Cabrera G., Corral G., Maya J.D., Zulantay I., Apt W., Kemmerling U. 2012. Reorganization of

- extracellular matrix in placentas from women with asymptomatic Chagas disease: mechanism of parasite invasion or local placental defense? J Trop Med. ID 758357, 8 pages.
54. Patni S., Wynen L.P., Seager A.L., Morgan G., White J.O., Thornton C.A. 2009. Expression and activity of Toll-like receptors 1-9 in the human term placenta and changes associated with labor at term. Biol Reprod. 80:243-248.
55. Triquell M.F., Diaz L.C., Freilij H., Paglini P., Fretes R.E. 2009. 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. 103:1011-1018.
56. Redline R.W. 2006 Inflammatory responses in the placenta and umbilical cord. Semin Fetal Neonatal Med. 11:296-301.
57. Altemani A.M., Bittencourt A.L., Lana A.M. 2000. Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in placental Chagas' disease: a qualitative and quantitative analysis. Am J Trop Med Hyg. 62:319-324.
58. Romero R., Gotsch F., Pineles B., Kusanovic J.P. 2007. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications and fetal injury. Nutr Rev. 65:194-202.
59. Fernandez A.S., Lambot M.A., Torrico F., Alonso V.C., Cordoba M., Suarez E., Christophe N.J., Carlier Y. 2005. Las lesiones placentarias en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 38:84-86.

60. Benirschke K., Kaufmann P., Baergen R. 2006. Pathology of the human placenta. Springer Science + Business Media, New York.
61. Carlier Y. 2005. Factors and mechanisms involved in the transmission and development of congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 38:11 105-107.
62. Virreira M., Truyens C., Alonso V.C., Brutus L., Jijena J., Torrico F., Carlier Y., Svoboda M. 2007. Comparison of *Trypanosoma cruzi* Lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. Am J Trop Med Hyg. 77:102-106.
63. Nanaev A.K., Kosanke G., Kemp B., Frank H.G., Huppertz B., Kaufmann P. 2000. The human placenta is encircled by a ring of smooth muscle cells. Placenta. 21:122-125.
64. Ouaisi M.A., Afchain D., Capron A., Grimaud J.A. 1984. Fibronectin receptor on *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes and their biological function. Nature. 308:380-382.
65. Jonsson A.M., Uzunel M., Gotherstrom C., Papadoginnakis N., Westgren M. 2008. Maternal microchimerism in human fetal tissues. Am J Obstet Gynecol. 198:325-326.
66. Tafuri W.L., Rocha A., Lopes E.R., Gomes J., Mineo J.R. 1984. Chagas' placentitis. Report of a case with optic and electronic microscopy study. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 26:152-159.
67. Bittencourt A.L., Rodrigues F.L.A., Galvao A.M.O., Jacomo K. 1981. Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of ten cases. Am J Trop Med Hyg. 30:38-42.

68. Akinbi H.T., Narendran V., Pass A.K., Markart P., Hoath S.B. 2004. Host defense proteins in vernix caseosa and amniotic fluid. *Am J Obstet Gynecol.* 191:2090-2096.
69. Moya P.R., Villagra L., Risco J. 1979. Congenital Chagas disease: anatomopathological findings in the placenta and umbilical cord. *Rev Fac Cienc Med Cordoba.* 37:21-27.
70. Jorg M.E. 1992. The transmission of *Trypanosoma cruzi* via human milk. *Rev Soc Bras Med Trop.* 25:83.
71. Hoft D.F., Farrar P.L., Kratz O.K., Shaffer D. 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun.* 64:3800-3810.
72. Jauniaux E., Gulbis B., Burton G.J. 2003. The human first trimester gestational sac limits rather than facilitates oxygen transfer to the fetus –a review. *Placenta.* 24:86-93.
73. Moretti E., Basso B., Castro I., Carrizo P.M., Chaul M., Barbieri G., et al. 2005. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38:53-55.
74. Zingales B., Andrade S.G., Briones M.R., Campbell D.A., Chiari E., Fernandes O., et al. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revisión meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104:1051-1054.
75. Burgos J.M., Altchch J., Bisio M., Duffy T., Valadares H.M., Scidenstein M.E., et al. 2007. Direct molecular profiling of minicircle signatures and

- lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. Int J Parasitol.37:1319-1327.
76. Puerto F.D., Sanchez Z., Nara E., Meza G., Paredes B., Ferreira E., et al. 2010. *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. Am J Trop Med Hyg. 82:386-390.
77. Falla A., Herrera C., Fajardo A., Montilla M., Vallejo G.A., Guhi F. 2009. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs vectors and humans. Acta Trop. 110:15-21.
78. Corrales R.M., Mora M.C., Negrette O.S., Diosque P., Lacunza D., Virreira M., et al. 2009. Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. Infect Genet Evol. 9:278-282.
79. Brabin L. 1992. The epidemiological significance of Chagas' disease in women. Mem Inst Oswaldo Cruz 87:73-79.
80. Salas N.A., Cot M., Schneider D., Mendoza B., Santalla J.A., Postigo J., et al. 2007. Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. Trop Med Int Health. 12:1498-1505.
81. Menezes C.A., Bittencourt A.L., Mota E., Sherlock I., Ferreira J. 1992. The assessment of parasitemia in women who are carriers of *Trypanosoma cruzi* infection during and after pregnancy. Rev Soc Bras Med Trop.25:109-113.

82. Breniere S.F., Bailly M., Carrasco R., Carlier Y. 1983. Transmission transplacentaire des anticorps anti-*Trypanosoma cruzi*. Cah. O. R. S. T. O. M. Ser Ent Med Parasitol. 21:139-140.
83. Vekemans J., Truyens C., Torrico F., Solano M., Torrico M.C., Rodriguez P., et al. 2000. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection upregulates capacity of uninfected neonate cells to produce pro- and anti-inflammatory cytokines. Infect Immun. 68:5430-5434.
84. Hermann E., Truyens C., Alonso V.C., Even J., Rodriguez P., Berthe A., Torrico F., et al. 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. J Infect Dis. 189:1274-1281.
85. Brutus L., Schneider D., Postigo J., Romero M., Santalla J., Chippaux J.P. 2008. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. Acta Trop. 106:195-199.
86. Scapellato P.G., Bottaro E.G., Rodriguez B.M.T. 2009. Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk? Rev Soc Bras Med Trop. 42:107-109.
87. Brutus L., Schneider D., Postigo J., Delgado W., Mollinedo S., Chippaux J.P. 2007. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. Trans R Soc Trop Med Hyg. 101:1159-1160.

88. Cuna W.R., Choque A.G., Passera R., Rodriguez C. 2009. Pro-inflammatory cytokine production in chagasic mothers and their uninfected newborns. *J Parasitol.* 95:891-894.
89. Marchant A., Goldman M. 2005. T cell-mediated immune responses in human newborns ready to learn? *Clin Exp Immunol.* 141:10-18.
90. Schijman A.G., Altcheh J., Burgos J.M., Biancardi M., Bisio M., Levin M.J. et al. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 52:441-449.
91. Torrico F., Alonso V.C., Suarez E., Rodriguez P., Torrico M.C., Dramaix M., et al. 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 70:201-209.
92. Grieves J.L., Hubbard G.B., Williams J.T., Vandeberg J.L., Dick Jr E.J., Lopez A.J.C., et al. 2008. *Trypanosoma cruzi* in non-human primates with a history of stillbirths: a retrospective study (*Papio hamadryas* spp) and case report (*Macaca fascicularis*). *J. Med Primatol.* 37:318-328.
93. Mjihdi A., Lambot M.A., Stewart I.J., Detournay O., Noel J.C., Carlier Y. et al. 2002. Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss. *Am J Pathol.* 161:673-680.
94. Hall C., Pierce E., Wimsatt A., Hobby D.T., Meers B. 2010. Virulence and vertical transmission of two genotypically and geographically diverse isolates of *Trypanosoma cruzi* in mice. *J Parasitol.* 96:371-376.

95. Moreno E.A., Rivera I.M., Moreno S.C., Alarcon M.E., Lugo Y.A. 2003. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in Wistar rats during the acute phase of infection. *Invest Clin.* 44:241-254.
96. Klein J.O., Baker C., Remington J.S., Wilson C. 2006. Current concepts of infections of the fetus and newborn infant. In: Remington J.S., Klein J.O., Wilson C., Baker C. (Eds.) *Infectious Diseases of the fetus and newborn infant.* Elsevier Saunders, Philadelphia, pp. 13-25.
97. Bittencourt A.L., Sadigursky M., Barbosa H.S. 1975. Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 17:146-159.
98. Torrico F., Alonso V.C., Suarez E., Tellez T., Brutus L., Rodriguez P., et al. 2006. Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? *Trop Med Int Health* 11:628-635.
99. Avila W.S., Rossi E.G., Ramires J.A., Grinberg M., Bortolotto M.R., Zugaib M., et al. 2003. Pregnancy in patients with heart disease: experience with 1,000 cases. *Clin Cardiol.* 26:135-142.
100. Sologuren Acha R., Oliveira R.M., Guzman H.R., Coehlo da Silva A., Santos R.E., Oliveira S.C. 2002. Prevalence of cardiac arrhythmias during and after pregnancy in women with Chagas disease without apparent heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 79:5-9.
101. Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 1:92-100.

102. Petersen E. 2007. Protozoan and helminth infections in pregnancy. Short-term and long-term implications of transmission of infection from mother to foetus. *Parasitology*. 134:1855-1862.
103. Dauby N., Alonso V.C., Suarez E., Flores A., Hermann E., Cordova M., et al. 2009. Maternal infection with *Trypanosoma cruzi* and congenital Chagas disease induce a trend to a type 1 polarization of infant immune responses to vaccines. *PLoS Negl Trop Dis*. 3:e571.
104. Andrade A.Q., Gontijo E.D. 2008. Neonatal screening for congenital Chagas infection: application of latent class analysis for diagnostic test evaluation. *Rev Soc Bras Med Trop*. 41:615-620.
105. Virreira M., Martinez S., Alonso V.C., Torrico F., Solano M., Torrico M.C. et al. 2006b. Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 75:1082-1084.
106. Okumura M., Aparecida D.S.V., Camargo M.E., Schultz R., Zugaib M. 2004. Prenatal diagnosis of congenital Chagas' disease (American tripanosomiasis). *Renat Diagn*. 24:179-181.
107. Torrico M.C., Solano M., Guzman J.M., Parrado R., Suarez E., Alonso V.C., et al. 2005. Estimation of the parasitemia in *Trypanosoma cruzi* human infection: high parasitemias are associated with severe and fatal congenital Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 38:Suppl. 2, 58-61.
108. Freilij H., Muller L., Gonzalez C.S.M. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congénita Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 18:327-330.

109. Mora M.C., Sanchez N.O., Marco D., Barrio A., Ciaccio M., Segura M.A., et al. 2005. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol.* 91:1468-1473.
110. Virreira M., Torrico F., Truyens C., Alonso V.C., Solano M., Carlier Y., Svoboda M. 2003. Comparison of Polymerase Chain Reaction Methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 68:574-582.
111. Diez C.N., Manattini S., Zanuttini J.C., Bottasso O., Marcipar I. 2008. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 78:624-627.
112. Rodriguez P., Truyens C., Alonso V.C., Flores A., Cordova M., Suarez E., et al. 2005. Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-*Trypanosoma cruzi* in samples of blood from newborns from mothers with positive serology for Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38: Suppl. 2, 62-64.
113. Umezawa E.S., Nascimento M.S., Kesper Jr. N., Coura J.R., Borges P.J., Junqueira A.C., et al. 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 34:2143-2147.
114. Corral R.S., Altcheh J., Alexandre S.R., Grinstein S., Freilij H., Katzin A.M. 1996. Detection and characterization of antigens in urine of patients with acute, congenital and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 34:1957-1962.

115. Azogue E., Darras C. 1995. Congenital Chagas in Bolivia: comparative study of the effectiveness and cost of diagnostic methods. *Rev Soc Bras Med Trop.* 28:39-43.
116. Russomando G., Almiron M., Candia N., Franco L., Sanchez Z.G.I. 2005. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38: Suppl 2, 49-54.
117. Mallimaci M.C., Sosa E.S., Russomando G., Sanchez Z., Sijvarger C., Alvarez I.M., et al. 2010. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del fuego, Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 82:55-59.
118. Carlier Y., Torrico F., Sosa E.S., Russomando G., Luquetti A., Freilij H. et al. 2009. Recommendations for diagnosis, treatment and control of congenital and paediatric Chagas disease and management of infection in pregnant women. WHO Global Network for Chagas Disease Elimination, technical Group IV a (congenital and paediatric *T. cruzi* infection/Chagas disease), Report of the New Orleans Meeting of December 11th, 2008.
119. Blanco S.B., Segura E.L., Cura E.N., Chuit R., Tulian L., Flores L., et al. 2000. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health.* 5:293-301.
120. Luquetti A.O. Dias J.C., Prata A. 2005^a. Diagnosis and treatment of congenital infection caused by *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38: Suppl. 2, 27-28.

121. Suarez E., Alonso V., Torrico F., Cordova M. 2005. Integral treatment of congenital Chagas disease: the Bolivian experience. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38: Suppl 2, 21-23.
122. Chippaux J.P., Clavijo A.N., Santalla J.A., Postigo J.R., Schneider D., Brutus L. 2010. Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. *Trop Med Int Health.* 15:87-93.
123. Sosa E.S., Cura E., Velazquez E., Yampotis C., Segura E.L. 2009^a. Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi* and prevention of congenital transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42:484-487.
124. Billot C., Torrico F., Carlier Y. 2005. Cost effectiveness study of a control program of congenital Chagas disease in Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38: Suppl.2, 108-113.
125. Chippaux J.P., Santalla J.A., Postigo J.R., Romero M., Salas C.N.A., Schneider D., Brutus L. 2009. Sensitivity and specificity of Chagas Stat-Pak® test in Bolivia. *Trop Med Int Health.* 14:732-735.
126. Abbas K.A., Lichtman H.A., Pillai S. 2009. Técnicas de laboratorio de uso habitual en Inmunología. *Inmunología Celular y Molecular.* 6^a edición. Elsevier Saunders.
127. da Silveira F.J., Umezawa S.E. Luquetti A.O. 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Review Trends in Parasitol* 17: 286-291.H

128. Albert B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. 2000. Molecular biology of the cell. 4th edition (New York, Garland Science).
129. Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
130. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1992. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction 1986. *Biotechnology*. 24: 17-27.
131. Holden N.S., Tacon C.E. 2011. Principles and problems of the electrophoretic mobility shift assay. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 63: 7-14.
132. Capurro H., Konichezky S., Fonseca D., Caldeyro B.R. 1978. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J Pediatr*. 93: 120--122.
133. Haynes A.B., Regenbogen S.E., Weiser T.G., Lipsitz S.R., Dziekan G., Berry W.R., Gawande A.A. 2011. Surgical outcome measurement for a global patient population: Validation of the surgical Apgar Score in 8 countries. *Surgery* 149: 519-524.
134. Luquetti O.A., Ponce C., Ponce E., Esfandiari J., Schijman A., Revollo S., Añez N., Zingales B., Ramgel A.R., Gonzalez A., Levin M.J., Umezawa E.S., da Silveira F.J. 2003. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic Microbiol Infect Disease* 46: 265-271.
135. Jiménez C.E., Campos V.G., Castellanos P.R., Romero P., Morales A.E. 2000. PCR and specific antibodies to *Trypanosoma cruzi* in blood

- donors at the central blood bank from Centro Medico Nacional de Occidente (IMSS), Guadalajara, Jalisco, México. *Bioquímica* 25: 99-104.
136. Dawson S.B., Trapp R.G. Bioestadística médica. 2ª edición. Ed Manual Moderno.
137. Torrico F., Alonso V.C., Suarez E., Rodríguez P., Torrico M.C., Dramaix M., Truyens C., Carlier Y. 2005. Nivel de endemia de la infección por *Trypanosoma cruzi* en el lugar de residencia de la madre y desarrollo de la enfermedad de Chagas congénita en Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38: Suppl 2, 17-20.
138. Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, de Aguilar V, Gonzales A, Zingales B, Rangel AR, Levin M, Esfandiari J, Umezawa ES, Luquetti AO, da Silveira JF. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of Chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi* –specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *J Clin Microbiol.* 2005;43:5065-5068.
139. Espinoza B., Rico T., Sosa S., Oaxaca E., Vizcaino C.A., Caballero G.M.L., Martínez I. 2010. Mexican *Trypanosoma cruzi* I strains with different degree of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *J Biomed Biotechnol.* 10:1155-1162.
140. Carlier Y., Truyens C. 2010. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. *American Trypanosomiasis Chagas disease*, DOI: 10.1016/B978-0-12-384876-5,00022-8
141. Virreira M., Torrico F., Truyens C., Alonso V.C., Solano M., Carlier Y., Svoboda M. 2005. Comparison of PCR methods for the diagnosis of

- congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Rev Soc Bras Med Trop. 38: Suppl 2: 65-67.
142. Bosseno M.F., Barnabe C., Magallon G.E., Lozano K.F., Ramsey J., Espinoza B., Breniere S.F. 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in México. J Clin Microbiol. 40(2):627-632.
143. Virreira M., Alonso V.C., Solano M., Jijena J., Brutus L., Bustamante Z., Truyens C., Schneider D., Torrico F., Carlier Y., Svoboda M. 2006. Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 75(5):871-879.
144. Guevara A.C., Garzón E., Bowen C., Córdoba X., Gómez E., Ouasssi A. 2005. High infection rates of *Triatoma dimidiata* are associated with low levels of *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in Pedro Carbo, Ecuador. Use of a tc24 gene-based PCR approach. Parasite 12:65-68.
145. Apt W., Zulantay I., Solari A., Ortiz S., Oddo D., Corral G., Truyens C., Carlier Y. 2010. Vertical transmisión of *Trypanosoma cruzi* in the province of Choapa, IV region, Chile. Preliminary report (2005-2008). Biol Res. 43(3):269-274.
146. World Health Organization. 1991. Control of Chagas disease (WHO, Technical Report Series), 811;38-47.
147. Torrico F, Castro M, Solano M, Rodriguez P, Cruz TM, Truyens C, Carlier Y. Efectos de la infección materna por *Trypanosoma cruzi* em el desarrollo del embarazo y del recién nacido. Rev Soc Bras Med Trop. 2005;38, suplemento II: 72-76.

ANEXOS

ANEXO 1

MEDIO LIT (Liver-Infusión-Triptona)

Revisado inicialmente por el Dr. Vaeger de la Universidad de Tulane. Los primeros reportes de crecimiento fueron por Camargo en 1964.

Reactivos:

Cloruro de sodio (NaCl)	4.0 g
Cloruro de Potasio (KCl)	0.4 g
Fosfato dibásico de sodio (Na ₂ HPO ₄)	8.0 g
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	2.0 g
Triptosa	5.0 g
Infusión de caldo de hígado	5.0 g
Hemina (C ₃₄ H ₃₂ Cl Fe N ₄ O ₄)	25 mg
Suero Bovino Fetal	10% Conc. final
H ₂ O d.d.e	1000 mL

Preparación:

- a. Primero se preparo la Hemina pesando 0.25 g en 5 mL de trietanol amina, se esterilizo por filtración.
- b. El suero estéril se inactivo 30 minutos a 56°C antes de tomar la cantidad necesaria para tener una concentración final al 10%.

- c. Con excepción de la Hemina y el Suero, todos los componentes se disolvieron en agua, se ajustó el pH 7.2 y se esterilizó por autoclave a 120°C (15 lb) durante 15 minutos. Se sometió a prueba de esterilidad 3 días y antes de ser usado se complementó con 50 μ L de Hemina por cada 100 mL de medio y con el 10% de suero fetal inactivado.

ANEXO 2

REACTIVOS

Amortiguador Fosfato Salino, PBS pH 7.4

Cloruro de Sodio (NaCl)	136 mM
Cloruro de Potasio (KCl)	26 mM
Fosfato de Potasio Monobásico (KH ₂ PO ₄)	1.7 mM
Fosfato de Sodio dibasico (Na ₂ HPO ₄)	8 mM

Amortiguador de lisis de Proteínas.

Nonidet p-40%	1%
Cloruro de Sodio (NaCl)	150 mM
Tris-HCl, pH 7.6 (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ .CHI)	10 mM
Fenilmetilsulfonil Florido (PMSF, C ₇ H ₇ FO ₂₅)	100 mM
Acido Etilendiamino Tetra acetico (EDTA)	2 mM
Aprotinina	1µg/mL
Pepstatina	1µg/mL
Leupeptina	1µg/mL

Amortiguador de Carbonatos, pH 9.6.

Bicarbonato de Sodio (NaHCO ₃)	0.1 N
Carbonato de Sodio (Na ₂ CO ₃)	0.1 N

Amortiguador Fosfato Salino-Tween 20 (PBST)

PBS	400 mL
Tween20 (Polyoxyetilen-sorbitan monolaurato)	0.05% (200 µL)

Solución de Bloqueo al 5%.

PBST	100 mL
Albúmina Serica Bovina	5 g

Amortiguador de Citrato Fosfato pH 5.

Acido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇).	0.1 M
Fosfato de Sodio dibasico (Na ₂ HPO ₄)	0.2 M

Solución Reveladora de la Reacción.

Amortiguador de Citrato-Fosfato	12 mL
o-fenilendiamina (C ₆ H ₈ N ₂)	0.0048 g
Peroxido de Hidrogeno (H ₂ O ₂)	1.4 µL

Solución para detener la Reacción.

Acido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	4 N
---	-----

Amortiguador de Lisis de DNA pH 8.

Acido Etilendiaminatetra acetico (EDTA)	0.1 M
Cloruro de Sodio (NaCl)	0.15 M
Dodecil Sulfato de Sodio (C ₁₂ H ₂₅ O ₄ Na, SDS 10%)	0.5% final
Proteinasa K	0.1mg/mL

Fenol pH: 8.

Fenol (C₆H₅OH)

Fundir el fenol en baño María a 65°C. Una vez liquido añadir 8-hidroxiquinoneina (o-phenylenediamine, 1,2-benzenediamine C₆H₈N₂, PM 108.1 g/mol hasta una concentración final de 0.1% g por cada 100 mL) añadir el volumen de Tris-HCl 1M pH 8, cuando se halla equilibrado, retirar la fase acuosa y añadir un volumen de Tris-HCl 0.1 M hasta que el fenol este aun pH 8, se guarda a 4°C protegido de la luz con una capa acuosa de Tris-HCl 0.1 M a pH 8

Fenol-Cloroformo-alcohol isoamilico 24:24:1.

Fenol (C ₆ H ₅ OH)	25 mL
Cloroformo (CHCl ₃)	24 mL
Alcohol isoamilico (C ₅ H ₁₂ O)	1 mL

Cloroformo-Alcohol isoamilico 24:1.

Cloroformo (CHCl ₃)	24 mL
Alcohol isoamilico (C ₅ H ₁₂ O)	1 mL

Etanol Absoluto.

Etanol Absoluto (CH₃ CH₂ OH)

Acetato de Sodio:

Acetato de sodio (C₂H₃O₂Na) 3 M

RNAsa.

RNAsa 200 µg/µL

Es una endorribonucleasa que actúa específicamente en residuos de pirimidina de cadena sencilla en el extremo 3' del RNA y corta la unión fosfato del nucleótido adyacente. Los productos terminales son pirimidina 3' fosfato terminal.

Solución STOCK de RNAsa	Concentración Final	Volumen
Tris-base 1 M pH 7.5 (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	10 mM	100 mL
Cloruro de Sodio (NaCl) 5 N	15 mM	30 mL
RNAsa	0.002 g	200 mg/mL
H ₂ O c.b.p		1 mL

Hervir la solución 10 minutos

Amortiguador Tris-EDTA pH 8.

Tris-HCl (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃).HCl)	10 mM
EDTA (C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O ₈ Na ₄ .H ₂ O)	1mM

Amortiguador Tris-Ácido Bórico-EDTA pH 8.

Tris-HCl ($\text{NH}_2 \text{C}(\text{CH}_2 \text{OH})_3$).HCl)	90 mM
Ácido Bórico $\text{H}_3 \text{BO}_3$	90 mM
EDTA ($\text{C}_{10} \text{H}_{12} \text{N}_2 \text{O}_8 \text{Na}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	2 mM

Amortiguador Jugo Azul.

Glicerol ($\text{HOCH}_2 \text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$)	50% (v/v)
Dodesil Sulfato de Sodio SDS($\text{C}_{12} \text{H}_{25} \text{O}_{24} \text{Na}$)	0.1% (v/v)
EDTA ($\text{C}_{10} \text{H}_{12} \text{N}_2 \text{O}_8 \text{Na}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0.1 M
Azul de Bromofenol (3', 3'', 5', 5''-tetra bromofenol sulfonftalein)	0.025% (p/v)
Xilenciano ($\text{C}_{25} \text{H}_{27} \text{N}_2 \text{O}_6 \text{S}_2 \text{Na}$)	0.025% (p/v)

Solución de Bromuro de Etidió.

Solución de Bromuro de Etidió.	10 mg/mL
--------------------------------	----------

Se usa para teñir geles de agarosa a una concentración final de 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

El bromuro de etidio es una sustancia mutagénica, cancerogénica y venenosa que ingresa por vía oral, cutánea y subcutánea; por lo que se debe tener extremo cuidado al utilizarlo, evitando su ingestión, inhalación o absorción por la piel, por ello siempre se deben usar guantes. Su descomposición por calor genera gases tóxicos de óxido nítrico. Después de usarse debe llevarse a cabo una descontaminación del material; adicionar agua para reducir la

concentración, adicionar permanganato de potasio 0.5 M, mezclar y adicionar ácido clorhídrico 2.5 N, mezclar y desechar la solución.

También se puede descontaminar con hidróxido de sodio 10 N durante 10 minutos o bien con carbón activado.

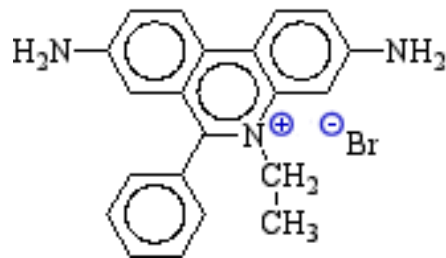


Figura 12 Estructura del Bromuro de etidio.

Agarosa.

Agarosa. (Grado Biología Molecular.) 1.5%

Es extraída de algas marinas, es un polímero lineal cuya estructura es:

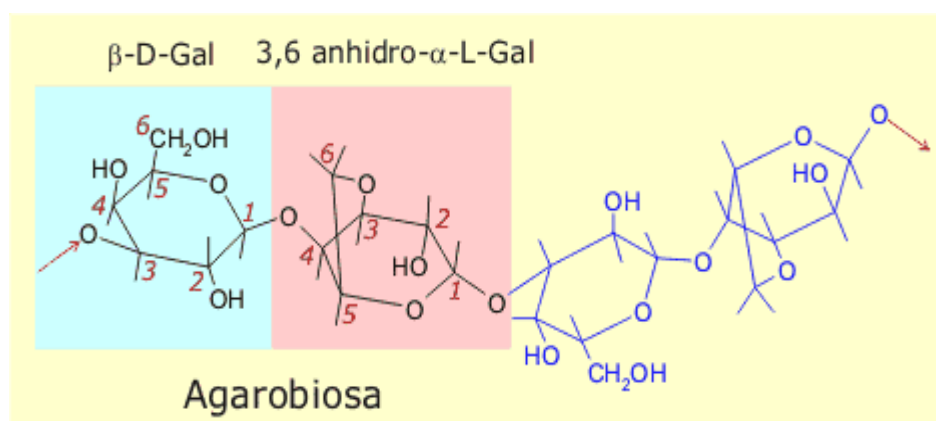


Figura 13 Estructura de la agarosa.

La polimerización de la agarosa forma una matriz y su densidad es determinada por la concentración de agarosa. Cuando el campo eléctrico es aplicado a través del gel, el DNA el cual es cargado negativamente a pH neutro migra al polo negativo. El rango de migración esta determinada por el peso molecular de DNA, concentración de agarosa, conformación del DNA, voltaje aplicado, dirección de campo eléctrico, temperatura, presencia de intercalantes (Bromuro de etidio) y composición del amortiguador de corrimiento.

ANEXO 3

Numero de folio: _____

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Carta de Consentimiento Informado

Fecha (dia/mes/año) _____

Título del Proyecto. Transmisión materno-fetal de *T.cruzi*: un problema de salud poco estudiado en México.

¿Por qué se hace este estudio?

En el sureste de nuestro país donde se encuentran los estados de Jalisco y Oaxaca, muchas personas incluyendo las mujeres embarazadas pueden estar infectadas por el parásito *Trypanosoma cruzi*, que provoca la enfermedad de Chagas. Este parásito se transmite frecuentemente por la picadura de una chinche, sin embargo, las personas infectadas no lo saben porque solo presentan síntomas hasta que la enfermedad ya está muy avanzada. Las mujeres embarazadas pueden transmitir el parásito a sus recién nacidos y por esto, la estamos invitando a usted que está embarazada a participar en este estudio.

Propósito del estudio

Se quiere conocer si usted esta infectada con este parásito y en caso de que así fuera, también se quiere conocer si su hijo ha nacido infectado por este parásito.

¿Cómo participara la madre en este estudio?

1. Se obtendrá una gota de sangre para buscar al parásito. El resultado se conocerá en los próximos 15 minutos.
2. Si el resultado es positivo a la enfermedad y si usted acepta participar, se le tomarán 10 mL de sangre venosa.

¿Cómo va a participar su hijo en el estudio?

1. Si usted acepta participar inmediatamente después de que nazca su hijo se le tomarán 2 mL de sangre del cordón umbilical. Este procedimiento no representa ninguna molestia ni riesgo para su hijo. En la sangre colectada se buscara si esta presente el parásito.
2. En caso de que se encuentre el parásito en la sangre de su hijo, se le citara en 4 ocasiones más. En la primera visita, que será después de los 8 meses de nacido, se le tomará una muestra de sangre venosa a su hijo para determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en suero. En caso de que el resultado sea positivo, el médico iniciara tratamiento, proporcionándole un medicamento y explicándole la forma en que debe dárselo a su hijo. En la siguientes 2 visitas que serán después de 3 y 6 meses, al niño se le continuara su tratamiento y se le obtendrá sangre de su talón en cada cita 20 gotas aproximadamente para saber si el parasito

se encuentra todavía en la sangre del niño. En la última visita (4 meses después), se obtendrán 2 mL de sangre por punción venosa del antebrazo para investigar si el parásito ha sido eliminado o no.

¿Cuánto tengo que pagar por el tratamiento de mi hijo, en caso de que tenga la enfermedad?

El tratamiento es gratuito, usted no pagará ni por el medicamento ni por los estudios que se realicen a usted y a su hijo.

¿Existen molestias o riesgos para mí o para mi hijo?

Usted tendrá molestias por el dolor que causa la punción de su dedo y su antebrazo. De la misma manera su hijo tendrá molestia por el dolor que le cause la punción del brazo y del talón. Sin embargo, el malestar es pasajero y no se considera que haya otro tipo de riesgo.

¿Qué pasará si yo no quiero participar?

No pasará nada en cuanto a la esmerada atención que usted debe recibir en esta unidad médica, por que esto es una invitación y nosotros respetamos su libre decisión de participar o no en esta investigación.

¿Puedo hacer preguntas si no he quedado satisfecho con la información me han dado?

Si; usted está en completa libertad de preguntar y aclarar cualquier duda. Y si fuera necesario podrá dirigirse con la Dra. Enedina Jiménez Cardoso,

investigador responsable, con dirección en Hospital Infantil de México Federico Gómez, Laboratorio de investigación en Parasitología. Teléfono (55) 55884019, Celular 0445513612404, Fax (55) 558840419, E-mail: enedina@servidor.unam.mx

Así como el

Dr.(a) _____ cargo _____

Institución _____

Teléfono _____

Celular _____

E-mail _____

Por lo antes expuesto:

Acepto participar SI NO

Nombre y firma de la madre:

Nombre

Firma

Testigo 1

Nombre

Firma

HISTORIA CLINICA MATERNA

1. Datos de Identificación:

I. Nombre:

ii. Edad:

iii. Dirección:

iv. Teléfono (celular): _____

v. E-mail: _____

vi. Tiempo de residencia actual: _____

vii. Edad gestacional: _____

2. Datos epidemiológicos:

i. Lugar de nacimiento:

ii. Procedencia: Local: _____ Foránea: _____

iii. Ha visitado otros lugares en:

a) las dos últimas semanas Si No

b) el último mes Si No

c) el último año Si No

Hepatomegalia	Sí	No
Esplenomegalia	Sí	No
Alteraciones cardiacas	Sí	No
Nódulos	Sí	No
Lesiones de membranas mucosas	Sí	No
Ictericia	Sí	No

4. Datos gineco-obstétricos:

i. Número de gestaciones _____

ii. Resolución de los embarazos:

Parto _____

Cesáreas _____

Aborto _____

Óbito _____

iii. Semanas de gestación por FUR _____

iv. Membranas:

Integras	Sí	No
RMP	Sí	No
Amniorexis	Sí	No
Corioamnioitis	Sí	No

HISTORIA CLINICA NOENATAL

1. Datos de identificación:

i. Fecha de nacimiento (dd/mm/aa) _____

ii. Sexo del producto: Femenino Masculino

iii. Edad gestacional _____

iv. Resolución del embarazo:

Parto Vivo Mortinato

Cesárea Vivo Mortinato

v. Valoración del APGAR a 1 minuto _____ 5 minutos _____

2. Somatometría

i. Peso al nacer (g) _____

ii. Talla al nacimiento (cm) _____

iii. Perímetro cefálico (cm) _____

iv. Alteraciones en hígado _____

v. Alteraciones en corazón _____

vi. Alteraciones digestivas _____

vii. Alteraciones neurológicas _____

viii. Anasarca _____

ix. Petequias _____

x. Síndrome de dificultad respiratoria (SDR) _____



Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico

Enedina Jiménez Cardoso^{a,*}, Guillermina Campos Valdéz^a, Adrián Cortes Campos^a,
Rene de la Luz Sanchez^a, Carlos Rivera Mendoza^b, Arturo Plascencia Hernández^b,
María Hernández Ramírez^c, Joel Ruiz Habana^d, Edmundo Bonilla González^{e,f},
Pablo Damian Matzumura^{e,f}, Yves Carlier^g

^a Laboratorio de Investigación en Parasitología, Dr. Márquez #162, Col Doctores, C.P. 06720, México

^b Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde, México

^c Hospital Regional de Pochutla, Oaxaca, México

^d Hospital General Dr. Pedro Espínosa Rueda, Pinotepa Nacional, Oaxaca, México

^e Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Izapalapa, México

^f Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana Izapalapa, México

^g Laboratoire de Parasitologie, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles (ULB), CP616, Route de Louvain 808, 1070 Bruxelles, Belgium

HIGHLIGHTS

- ▶ The seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women was analyzed in two states of Mexico.
- ▶ The rates and consequences of maternal-fetal transmission were determined by serology.
- ▶ It is necessary to determine the risk factors associated with vertical transmission of *T. cruzi*.
- ▶ The treatment should be administrated immediately after the diagnosis.

GRAPHICAL ABSTRACT

Table 1
Prevalence of *T. cruzi* seroreactivity among pregnant women and rate of transmission to newborns.

Region	Seroprevalence among pregnant women (%)	Fetal (cord) PCR (%)
Oaxaca	20.7% (9/43) ^a	7.0% (2/28)
Jalisco	13.0% (15/115) ^b	6.7% (7/103)
México DF	4.0% (4/100)	0%
Stratified	12.7% (28/220)	11.0% (41/371)

^a These values should be read as an index of maternal infection as determined by seroreactivity of antibodies.

Table 2
Percentage of newborns in addition to mother seroreactivity the detection of antibodies at 2/3 years old.

Region	Presence of antibodies, n (%)
Oaxaca	2/11 (18.2%)
Jalisco	4/57 (7.0%)
México DF	0/10 (0%)
México DF	0/10 (0%)

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 October 2011

Received in revised form 16 February 2012

Accepted 28 May 2012

Available online 7 June 2012

Keywords:

Trypanosoma cruzi
Congenital chagas disease
Maternal transmission

ABSTRACT

The first case of neonatal Chagas was reported in Mexico in 1998, but there have been no studies since then. Therefore, we investigated the rates of congenital infection of *Trypanosoma cruzi* by examining the seroprevalence among 1448 pregnant women in Oaxaca, Jalisco and Mexico City. We performed ELISAs to screen for recombinant and total antigens in mothers, and examined the frequency of congenital *T. cruzi* transmission by PCR with cord blood and antibody testing in children when they reached two years old. Our results showed that the prevalence of infection in pregnant women was 7.32% (106/1448) overall, and 4.4% (35/794) in Oaxaca, 12.02% (67/557) in Jalisco and 4.12% (4/97) in the Mexico City. In Oaxaca, *T. cruzi* infection was detected by PCR in 20% (7/35) of infants born to seroreactive mothers and 11.9% (8/67) in Jalisco. No infections were identified in infants from the Mexico City. From these only eleven serological follow up their children are agree to take blood. Therefore, the maternal-fetal overall transmission rate was 4.08% (4/98) in Oaxaca and 9.1% (3/33) in Jalisco. 1.5% (1/65) children with positive serology were given specific treatment Chagas. In conclusion, these are the first reports of the rates of congenital Chagas disease in Mexico. The seroprevalence was higher in mothers from Jalisco, and could

* Corresponding author. Address: Hospital Infantil de México Federico Gómez, México. Fax: +52 55884019.

E-mail addresses: enedina@servidor.una.mx, jimenezce@yahoo.com.mx (E.J. Cardoso).

be related to that there is not the periodic fumigation of the transmitting vector performed in that state. The high rates of maternal–fetal transmission found in Oaxaca could be related to the differences of pathogenicity of trypanosome. No association between both the rate of congenital transmission and the gynecologic anthropometric data was observed.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Maternal–fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* has been reported in various Latin American countries, such as Argentina (Zaidenberg, 1997; Altcheh et al., 2005; Gürtler et al., 2003), Bolivia (Azogue et al., 1985; Torrico et al., 2004; Bern et al., 2009; Brutus et al., 2007), Brazil (Nisida et al., 1999; Rassi et al., 2004; Thiermann et al., 1985; Bittencourt et al., 1985), Chile (Thiermann et al., 1985; Schenone et al., 1991; Apt et al., 2010), and Paraguay (Russomando et al., 2005), to rates up to 12% of infected mothers (Carlier and Torrico, 2003; Carlier and Truyens, 2010). However, such transmission route has been little studied in Mexico where only one case of congenital Chagas disease has been reported (Guzmán et al., 1998), while prevalence of *T. cruzi* infection in pregnant women has been estimated to 5% in Chiapas, 3.5% in Veracruz and 0.6% in Yucatan and 0.4% in Guanajuato (Olivera Mar et al., 2006; Sosa-Estani et al., 2008; Gamboa-León et al., 2011).

Studies carried out in 1989 by the Mexican National Serological Survey reported an average of 1.6% *T. cruzi* seroprevalence in blood banks (Velasco et al., 1992), whereas Cruz-Reyes (Cruz-Reyes and Pickering-Lopez, 2006) mentioned a seroprevalence of 5.9% in 2006. The National Institute of Statistics of Mexico recorded 2.6 million births in 2005 (Nacional de Geografía e Informática, 2000). Considering that 5.9% of pregnant women might be infected with *T. cruzi*, and a maternal–fetal transmission rate of 5% 6136 infants might be estimated congenitally infected with this parasite each year in Mexico. This transmission route might significantly contribute to the infection of the 155,000 children less than five years old estimated being at risk of infection in Mexico (Guzmán-Bracho, 2001).

In most studies carried out in South American countries 60–90% of cases of congenital Chagas disease are asymptomatic, rendering difficult. The infection diagnostic make in timely and manner endangering the health of the babies (Carlier and Torrico, 2003; Carlier and Truyens, 2010). Furthermore, the symptoms of congenital Chagas disease are not specific and diverse, including low birth weight premature birth, respiratory disorder syndrome, anasarca, Apgar scores lower than 7 (at 1 min), hepatosplenomegaly, meningoencephalitis and myocarditis, which may lead to infant death (Carlier and Torrico, 2003; Carlier and Truyens, 2010; Freilij and Altcheh, 1995). Detection of *T. cruzi* specific antibodies in serum is currently used for diagnosing *T. cruzi* infection in pregnant women, whereas parasitological tests (determining the presence of live parasites in blood) are recommended for investigating infection in newborns. Congenital infection can be confirmed also by the detection of antibodies in babies from eight months after birth, i.e. after the disappearance of transferred maternal antibodies (Carlier and Truyens, 2010; Carlier et al., 2012). Polymerase chain reaction (PCR) can be used to detect the presence of parasitic DNA in newborn blood (Svoboda et al., 2011; Virreira et al., 2003); however, the congenital infection should be confirmed later by the persistence of positive PCR, parasitological or serological or tests at eight months of age (Carlier et al., 2012; Svoboda et al., 2011).

The aim of this study was to investigate: (i) the seroprevalence of *T. cruzi* infection in pregnant women in different institutions belonging to the states of Oaxaca, Jalisco and Distrito Federal, (ii) to seek the presence of parasite DNA in the umbilical cord blood

of their newborns (PCR), and (iii) to investigate *T. cruzi* specific antibodies in blood of these infants when 2 years old, in order to identify possible cases of congenital transmission.

2. Materials and methods

2.1. Patient cohorts, sample collections and maternal obstetrical histories

A total of 1448 pregnant women and 1458 (10 twins) newborns/infants were enrolled from September 2006 to June 2008 in different areas of Mexico: 794 pairs in Oaxaca state (60 from the General Hospital of Oaxaca, 545 from the Regional Hospital of Pochutla and 189 from the General Hospital Dr. Pedro Espinoza in Santiago Pinotepa Nacional); 558 pairs in Jalisco state (Civil Hospital Fray Antonio Alcalde in Guadalajara); 97 pairs in DF (National Institute of Perinatology, Mexico City). All pregnant mothers willingly agreed to participate to the study by signing a letter of consent approved ethic protocol by the Children Hospital of Mexico Federico Gomez.

Maternal blood (3 mL) was collected before the delivery when was a normal delivery and at the moment when was by cesarean. Umbilical cord blood (3 mL) was collected in all babies at the moment delivery for PCR investigation.

All enrolled pregnant women provided answers to a questionnaire asking their age, present address, place of birth, received blood transfusions, number, resolution and gestational age of previous pregnancies. Following birth, a clinical examination was conducted for each baby, recording the following data: date of birth, sex, gestational age (Capurro et al., 1978), Apgar scores (Apgar Score, 2001), birth weight, size, head circumference and abnormalities in liver, heart and/or digestive tract (It was looking for clinical and biological test).

2.2. Investigations of *T. cruzi* specific antibodies in mothers

Chagas Stat-Paks and ELISA were used to determine the seroprevalence of *T. cruzi* infection in mothers, the first one before and second after the delivery. Chagas Stat-Pac (Chembio Diagnostic Systems, Inc, Medford, NY) was performed with 10 µL of maternal whole blood and the results were analyzed after 15 min, according to the manufacturer's instructions. ELISA was performed as previously described (Jiménez et al., 2000) by using an antigenic extract of a previously isolated Mexican strain of *T. cruzi*, maternal serum diluted 1:250 in PBS and a peroxidase-labeled anti-human IgG conjugate (diluted 1:10,000; BIOSOURCE, CA, USA). Both tests were applied to all pregnant women and were considered positives only how had both positives tests. When we had discrepancies between both tests, we repeated the serological tests. The positive serological results obtained in mothers at delivery with both tests mentioned above was confirmed 19–43 months after delivery, using a commercially available ELISA using a *T. cruzi* recombinant antigen (Accutrack Chagas recombinant Micro-ELISA test, Lemos Laboratory SRL, Buenos Aires, Argentina) according to the manufacturer's instructions.

Sample analyses were performed in triplicate and the results were averaged. For both ELISA tests, the threshold absorbances

were established using 25 control serum samples obtained from healthy people without histories of visits to endemic areas (mean + 2 SD). Serum samples were considered positive for absorbances >0.167 and 0.162, for the home-made and Accutrack Chagas recombinant ELISA, respectively.

2.3. PCR analysis of umbilical cord blood

DNA was extracted from cord blood samples (300 µL) using phenol, chloroform and ethanol. *T. cruzi* DNA was amplified following the method of Virreira (Virreira et al., 2003), using the primers Tcz1 (5'-CGA-GCT-CTT-GCC-CAC-ACG-GGT-GCT-3') and Tcz2 (5'-CCT-CCA-AGC-AGC-GGA-TAG-TTC-AGG-3'). Positive control was DNA extracted from *T. cruzi* tripomastigotes (Mexican strain) and negative controls were DNA extracted from pregnant woman not infected and DNA extracted from culture derived *Ameba* sp., this were included always.

2.4. Serological follow-up of newborns displaying positive PCR at birth

Antibody investigations in infants with serological positive mother were confirmed 19–43 months after born using both the house-made- and the Accutrack Chagas recombinant-ELISAs mentioned above for pregnant women.

In order to avoid false positives ELISA use for determination of antibodies in sera from pregnant mothers. We used positive and negative controls and we validate results by specific lineal sensitivity and precision. We determine the cut off value using the shove controls.

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed with SPSS software. Data were evaluated by the Pearson Chi square statistical test, and differences were considered significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Patient cohorts, sample collections and maternal obstetrical histories

The gynecological and demographic characteristic and relation with seropositivity of mothers in three Mexican states are shown in Table 1 and this indicates the distribution of ages and times of residence of enrolled pregnant women in the considered areas, as well as their obstetrical histories according to their *T. cruzi* infection status. No statistically significant differences could be recorded comparing data of infected and uninfected mothers. Particularly, the frequencies of abortions, stillbirths, premature rupture of membranes and premature births were similar in both groups of mothers.

3.2. Investigation of *T. cruzi* specific antibodies in mothers

Seroprevalences of *T. cruzi* infection in pregnant women are indicated in Table 2. Interestingly, the prevalence of *T. cruzi* infection in pregnant women living in Jalisco was significantly three times higher than those in Oaxaca (12.0 vs 4.4, $p < 0.05$). Most positive subjects in Jalisco lived in the center of state, in the cities of Tlaquepaque, Tonalá, El Salto, Zapopan, and Jocotepec where the

Table 1
Gynecological and demographic characteristics and relation with sero-positivity of mothers in three Mexican states.

Parameter	Subgroups	Oaxaca ^a		Jalisco ^a		Mexico D.F. ^a	
		+ N = 35	- N = 750	+ N = 67	- N = 490	+ N = 4	- N = 93
Age range (years)	13–20	14	260	24	152	1	19
	21–30	15	406	29	226	2	25
	31–40	6	88	11	106	1	42
	>40	0	5	3	6	0	7
Time of residence (years)	0–10	4	165	5	46	0	5
	11–20	17	278	26	171	1	23
	21–30	12	261	26	208	2	27
	31–40	2	53	9	67	1	36
	>40	0	2	1	3	0	2
Gravidity	1	17	314	20	154	2	40
	2	10	185	18	116	1	18
	3	2	116	12	89	1	17
	4	2	66	10	60	0	9
	≥ 5	4	78	7	70	0	9
Abortion history	Yes	4	72	9	79	1	29
	No	31	687	58	411	3	64
Caesarian section history	Yes	11	249	32	192	1	24
	No	24	510	35	298	3	69
History of perinatal death	Yes	0	6	0	6	0	5
	No	35	753	67	484	4	88
Rupture of membranes	Yes	9	148	14	159	2	25
	No	26	611	53	331	2	68
Gestational age (weeks since LMP)	<30	0	7	2	10	0	1
	30.1–40	28	612	52	418	3	79
	≥ 40.1	7	140	13	62	1	13
Blood products received	Yes	0	17	3	14	0	0
	No	35	742	64	476	4	93

+, Serology positive; -, serology negative; LMP, last menstrual period.

^a $p > 0.05$.

Table 2
Prevalence of *T. cruzi* infection among delivering mothers and rate of transmission to newborns.

Region	Seroprevalence among mothers n/N (%)	Positive chord PCR n/N (%) ^a
Oaxaca	35/794 (4.4) ^b	7/35 (20.0)
Jalisco	67/557 (12.02) ^b	8/67 (11.9)
Mexico D.F.	4/97 (4.12)	0/4 (0)
All regions	106/1448 (7.32)	11/106 (14.15)

^a Percent positive chord results served as an index of maternal–fetal transmission as determined by the presence of antibodies.

^b $p < 0.05$.

vectorial transmission is less but the infected blood is the way of transmission more important in this zones.

3.3. PCR analysis of umbilical cord blood

The PCR results of umbilical cord blood of *T. cruzi* seropositive mothers are presented displays and in Fig. 1 some examples of such positive results. A higher frequency of positive PCR was observed in cord blood of Oaxaca than Jalisco (20.0% vs 11.9%, $p < 0.05$), whereas examined blood samples from Mexico remained all negative Table 2.

The geographical distributions of such PCR positive newborns in the states of Oaxaca and Jalisco are presented in Fig. 2a and b.

Table 3 showing anthropometric data at birth of infants with PCR positive compares sex ratio, gestational ages, APGAR scores, birth weights, sizes and head circumferences of newborns displaying positive and negative PCR. All these data were within the normal ranges and similar in both positive and negative PCR neonate groups, with the exception of APGAR scores which were >7 for all PCR negative newborns, whereas 7/15 (46.66%) newborns were below 7 in the PCR positive group. No abnormalities were detected in liver, cardiac or digestive tract functions.

3.4. Serological follow-up of newborns displaying positive PCR at birth and their mothers

Table 4 shows changes serology findings from time of delivery to 2-year follow up for mothers in the state of Oaxaca and Jalisco the children were two years old (between 24 and 36 months of age), *T. cruzi* specific antibodies were detected in 3/33 (9.1%), 1/65 (1.5%) infants of seropositive mothers in Oaxaca, Jalisco to Mexico, respectively, i.e. an average of 4/98 (4.08%) for these three Mexican areas (Tables 5 and 6). The mothers of two PCR positive children from Oaxaca and two PCR positive children from Jalisco

did not consent to having their children's blood drawn again. The infants mentioned above (3 infants from Oaxaca and 1 from Jalisco) displayed both a positive PCR at birth (umbilical cord) and a positive serology at 2 years of age, suggesting that their infection with *T. cruzi* had been transmitted congenitally.

4. Discussion

This study demonstrated the prevalence of *T. cruzi* maternal–fetal transmission in Mexico and investigated the risk factors involved in vertical transmission. For this study, we determined the infection rates in pregnant women in two areas endemic for *T. cruzi*. The results showed a 7.32% overall infection rate, but indicated that the seroprevalence was three times lower in Oaxaca than in Jalisco. These differences may indicate that the risk factors in the two states are different. In Oaxaca, the study was conducted in a rural area, while in Jalisco; the study was conducted in a sub-urban metropolitan area. In a rural zone, fumigation is often performed for vector population control, but fumigation is not often performed in Jalisco state even though the vector is present. Another explanation for the apparent higher seroprevalence in Jalisco than in Oaxaca could be due to the smaller sample size that in Oaxaca or another possibility is that in Jalisco, as urban area, the positive mothers migrating from other surrounding areas/states with high vectorial transmission. These results are similar to other reports on the seroprevalence in pregnant women in the adjacent states of Chiapas and Veracruz, in which it was determined that the seroprevalence in 145 pregnant women was 4.1% (Olivera Mar et al., 2006).

Upon analysis of PCR results, we observed a higher proportion of newborns in Oaxaca with *T. cruzi* DNA in cord blood (20%) compared with infants in Jalisco (11.9%). However we cannot say that there was transmission of the parasite because it is possible that positivity can be explained by DNA fragments of *T. cruzi* as positive by PCR for considering transmission should take into account the definition established by other authors Carlier and Torrico (Carlier and Truyens, 2010) where the parasite has successfully passed the placenta and dare after a baby's own antibodies form that infected shows at least eight months after birth, and our results showed that DNA single step 2 babies because after 2 years showed no antibodies own four of them certain ELISA y ACCUTRAC the standard serology (after the disappearance of transferred maternal antibodies) which is confirmed by Chagas Neonatal. The combination of positive PCR at birth and positive serology at two years strongly argues for a possible maternal–fetal transmission of parasites confirming the occurrence of congenital Chagas disease in Mexico (Guzmán et al., 1998). Our PCR results showed that seven newborns in Oaxaca were PCR positive for *T. cruzi*, but the mothers

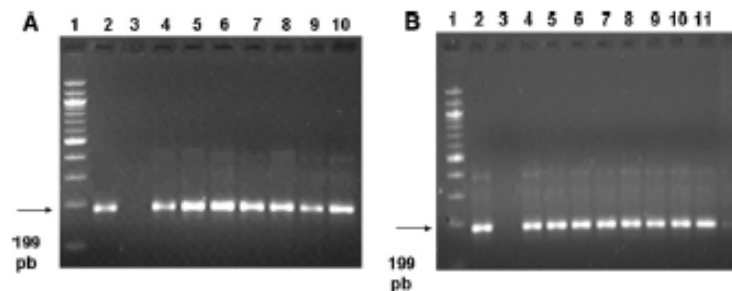


Fig. 1. PCR of newborns: line 1: MW, line 2: control positive, line 3: control negative PCR from umbilical cord from newborns A from Oaxaca and B from Jalisco.

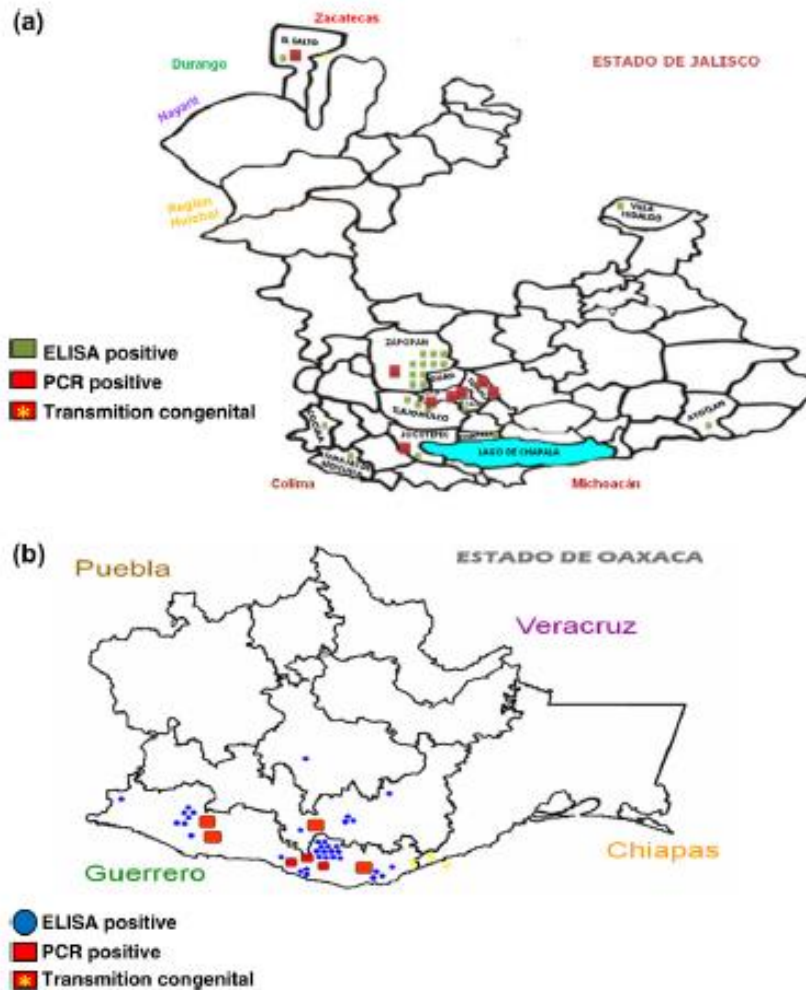


Fig. 2. Geographical distributions of PCR positive newborns in the states of (a) Jalisco and (b) Oaxaca.

of two children did not consent to blood tests at two years of age. Therefore, only five children were re-evaluated at that time, of which three had antibodies against *T. cruzi*. In Jalisco, eight infants tested positive for *T. cruzi* by PCR, but only six of the mothers consented to have their child's blood drawn at two years of age. Of the six, only one had antibodies against *T. cruzi*, resulting in congenital infection rates of 1.5% in Jalisco and 9.1% (three infants) in Oaxaca overall. One possibility explanation is that the placenta does not always allow for the passage of parasite immune activity that allows you to step through it. The activation of TL4 during placental infection promotes innate immune responses to be released into the maternal blood including pro-inflammatory cytokines, chemokines, and oxygen and nitrogen intermediates (Abrahams, 2008). In addition, the known FcRn, expressed by trophoblast cells (Solana et al., 2002) could facilitate phagocytosis of antibody-opsonized parasites. Overall, this innate immune response against placental parasitemia could reduce fetal transmission and limit or prevent

fetal stem parasites. *In vitro* studies demonstrating the low rate of parasites present on the villus (Lujan et al., 2004), parasite death mediated by nitric oxide (NO) produced by the placenta (Triquell et al., 2009) coupled with inflammatory factors of the placenta in congenital infection support the possibility that maternal immunology could play an important role in maternal-fetal transmission of *T. cruzi* (Carlier and Truyens, 2010; Hermann et al., 2010; Fernandez-Agular, 2005). In conclusions you have to consider maternal-fetal transmission as the one given by the mother through the placenta with an infant immune response after 8–24 months. (a) Positive PCR reaction can be obtained by DNA fragments from the parasite or death parasite. Such observation has been published and is due to parasite destruction for the antibodies *T. cruzi* specific and other factors mentioned in the text. (b) Children with positive PCR, could not be infected, and this is why we have seven PCR positives. The transmission was documented in five children since two of the mothers, did not allow us to take blood. Only three

Table 3
Anthropometric data at birth of infants with positive PCR results in Oaxaca and Jalisco.

Case	Date of birth (dd/mm/yyyy)	Sex	Gestational age (weeks) ^a	APGAR scores		Weight (g)	Length (cm)	Head circumference (cm)	PCR	
				1 min	5 min					
A. Oaxaca										
185 ^b	17/02/2008	Male	39	Alive sick	6	8	3420	50	34	+
344	06/03/2008	Female	38	Alive well	9	9	3000	49	33	+
350	30/03/2008	Female	38	Alive well	8	9	2850	52	34.5	+
406	17/03/2008	Female	40.4	Alive well	5	9	2950	49	31.5	+
569	19/04/2008	Male	42	Alive well	8	9	3500	51	34.5	+
052	06/05/2008	Male	40	Alive well	8	9	3330	51	36	+
076	13/05/2008	Male	37	Alive well	8	9	2525	48	31	+
B. Jalisco										
190	06/03/2007	Female	36.4	Alive well	6	9	2500	49	33	+
191	07/03/2007	Male	38.4	Alive well	7	9	4140	58	37	+
238	15/03/2007	Male	40.3	Alive well	9	9	3300	51	36	+
255	09/04/2007	Male	41.2	Alive well	9	10	3860	56	37	+
276 ^c	17/04/2007	Male	40.3	Alive well	8	9	3790	54	34	+
301	23/04/2007	Male	40.3	Alive sick	6	7	3840	57	35	+
372 ^d	06/06/2007	Male	37.1	Alive sick	7	7	2670	54	33	+
516 ^e	27/09/2007	Male	38.2	Alive well	7	10	3410	54	36.5	+

^a Determined by the Caparno method and reported as weeks since last menstrual period.

^b Alive sick gastrointestinal disease at birth.

Table 4

Serology findings from time of delivery to >2-year follow up for mothers in the state of Oaxaca and Jalisco.

Case	Time of birth		>2 Years after delivery	
	Immuno-chromatography	Total Ag ELISA ^a	Immuno-chromatography	Recombinant ELISA ^b
Serology of the mother of Oaxaca				
185	Positive	1.98	Positive	0.290
344	Positive	1.84	N.A.	N.A.
350	Positive	1.18	Positive	1.9
406	Positive	0.802	Positive	0.292
569	Positive	1.95	Positive	0.320
052	Positive	1.786	N.A.	N.A.
076	Positive	1.055	Positive	0.293
Serology of the mother of Jalisco				
190	Positive	1.167	Positive	0.228
191	Positive	1.251	Positive	0.28
238	Positive	1.507	N.A.	N.A.
255	Positive	1.853	N.A.	N.A.
276	Positive	1.422	Positive	0.297
301	Positive	0.953	Positive	0.261
372	Positive	1.778	N.A.	N.A.
516	Positive	1.507	Positive	0.265

^a Cohort point of total Ag ELISA: $0.113 + 2(0.027) = 0.167$.

^b Cohort point of recombinant ELISA: $0.127 + (0.017) = 0.162$.

Table 5

Children's serology data at 24-month follow up and relation to development of neonatal Chagas disease.

Case	Serology at 24 months of age		Neonatal Chagas disease
	Total Ag ELISA ^a	Recombinant ELISA ^b	
A. Oaxaca			
185	1.26	2.25	Positive
344	N.A.	N.A.	N.A.
350	0.091	0.126	Negative
406	0.056	0.09	Negative
569	0.909	0.293	Positive
052	N.A.	N.A.	N.A.
076	0.697	0.245	Positive
B. Jalisco			
190	0.058	0.103	Negative
191	0.065	0.124	Negative
238	0.074	0.133	Negative
255	N.A.	N.A.	N.A.
276 ^c	0.060	0.070	Negative
276 ^d	N.D.	N.D.	STAT-PAK positive
301	0.06	0.168	Negative
372	N.A.	N.A.	N.A.
516	0.824	0.266	Positive

N.A., not accepted; N.D., not determined.

^a Cohort point of total Ag ELISA: $0.113 + 2(0.027) = 0.167$.

^b Cohort point of recombinant ELISA: $0.127 + (0.017) = 0.162$.

^c Same mother as case 276.

^d Same mother as case 276, but second child.

Table 6

Percentage of transmission in children's according the detection of antibodies at >2 years old.

Region	Presence of antibodies, n/N (%)	
	Negative	Positive
Oaxaca	2/33 (6.06)	3/33 (9.09)
Jalisco	4/65 (6.15)	2/65 (3.07)
Mexico D.F.	0/4 (0)	0/4 (0)

the last children, had antibodies to *T. cruzi* (c) From eight children with positive PCR, two of the mothers did not allow us to take blood, from the remaining six, only one was positive for antibodies. Treatment was given according to the Mexican official norm No. 032SSA 2010. With a weight up to 40 kg, they received Niturtimox (Lamprit) 10–12 mg/24 h/60 days, with an initial dose of 50% for 48 h. In addition, one possible explanation about the differences between frequencies of congenital transmission in Oaxaca and Jalisco is that Oaxaca is a rural area with higher risk vector transmission because the triatomine species found in domestic and peridomestic habitats (Ramsey et al., 2000).

Evaluation of the parameters examined in the children showed differences in the APGAR score in newborns with positive *T. cruzi* PCRs, indicating that these infants were less physically developed than infants with negative *T. cruzi* PCRs. However, this parameter is not indicative of congenital Chagas disease, suggesting this difference is due to the nutritional, metabolic, immunologic or clinical status of the mothers, rather than due to trans-placental infection by *T. cruzi*.

The symptoms of congenital Chagas are very diverse, ranging from children with low weight and size to premature births, respiratory disorder syndrome, anasarca, APGAR score <7, hepatosplenomegaly, meningoencephalitis and myocarditis; which are indicative signs that can lead to the death of the kid (Carlier and Truyens, 2010; Torrico et al., 2007). However, all children in this study were asymptomatic, regardless of PCR results. Yet, the congenital infection should be confirmed by serology at two months of age.

For the first time, we have determined the seroprevalence of *T. cruzi* in pregnant women in two states of the Mexican republic as well as the rates and consequences of maternal–fetal transmission. Further studies are underway to determine the public health problems associated with vertical transmission of *T. cruzi* in Mexico.

Acknowledgments

Pan American Health Organization. Technical Services Agreement. Reg file. 1KM/RC/RGP/MEX-3309, Allotment DCP NDR 124 PG 04-05 999, Obligation. USO 05/063047.

Posgrado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa que pertenece al Padrón de excelencia de CONACYT.

References

Abraham, V.M., 2008. Pattern recognition at the maternal–fetal interface. *Immunol. Invest.* 37, 427–447.

Alzhebe, J., Biancastri, M., Lapella, A., Ballering, G., Freilij, H., 2005. Congenital Chagas disease: experience in the Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 41–45.

Appar Score, 2001. Still Viable for Predicting Neonatal Survival. *J. Watch Womens Health* 2.

Apt, W., Zulacay, I., Sokari, A., Ortiz, S., Oddo, D., Corsi, G., Truyens, C., Carlier, Y., 2010. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the province of Chuapa, IV Region, Chile: preliminary report (2005–2008). *Biol. Res.* 43, 269–274.

Azogue, E., La Fuente, C., Darras, C., 1985. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 79, 176–180.

Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R.H., Lafuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., Pacari, J., Del Carmen Abastador, M., Aparicio, H., Brady, M.F., Ferrufino, L., Angulo, N., Marcus, S., Sterling, C., Maguire, J.H., 2009. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1667–1674.

Blitencourt, A.L., Mota, E., Filho Ribeiro, R., Fernandes, L.G., Almeida, P.R., Sherlock, I., Maguire, J., Piesman, J., Tood, C.W., 1985. Incidence of congenital Chagas' disease in Bahia, Brazil. *J. Trop. Pediatr.* 31, 242–248.

Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Delgado, W., Molinero, S., Chippaux, J.P., 2007. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 101, 1159–1160.

Capurro, H., Konichevsky, S., Fonteca, D., Caldeyro-Barcia, R., 1978. A simplified method for diagnosis of gestational age in the newborn infant. *J. Pediatr.* 93, 120–122.

Carlier, Y., Torrico, F., 2008. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 767–771.

Carlier, Y., Truyens, C., 2010. Maternal–fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. In: Tellez, J., Tbayrenc, M. (Eds.), *American Trypanosomiasis, Chagas Disease: One Hundred Years of Research*. Elsevier, pp. 530–581.

Y. Carlier, F. Torrico, S. Sosa-Estani, G. Russomando, A. Laqueti, H. Freilij, P. Albajar Vinas, 2012. Congenital Chagas' disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings, and pregnant women. *PLoS Negl. Trop. Dis.*

Cruz-Reyes, A., Pickering-Lopez, J.M., 2006. Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 101, 345–354.

Fernandez-Aguilar, S., Lambot, M.A., Torrico, F., Alonso-Vega, C., Cordoba, M., Suarez, E., Noel, J.C., Carlier, Y., 2005. Placental lesions in human *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. (Suppl. 2)*, 84–86.

Freilij, H., Alzhebe, J., 1995. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis.* 21, 551–555.

Gamboa-León, R., Gonzalez-Ramirez, C., Padilla-Raygoza, N., Sosa-Bitani, S., Gamal-Kantun, A., Buelkens, P., Dumontell, E., 2011. Do commercial serologic tests for *Trypanosoma cruzi* infection detect Mexican strains in women and newborns? *J. Parasitol.* 97, 338–343.

Gürter, R.E., Segura, E.J., Cohen, J.E., 2003. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 29–32.

Guzmán, R.C., LaHuerta, S., Velasco, C.O., 1998. Chagas disease. First congenital case report. *Arch. Med. Res.* 29, 195–196.

Guzmán-Baccho, C., 2001. Epidemiology of Chagas disease in México: an update. *Trends Parasitol.* 17, 372–376.

Hemann, E., Berthe, A., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Parada, R., Torrico, F., Carlier, Y., Braud, V.M., 2010. Killer cell immunoglobulin like receptor expression induction on neonatal CD8(+) T cell in vitro and following congenital infection with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology* 129, 418–426.

Jiménez, C.E., Campos, V.G., Castañares, P.R., Romero, P., Morales, A.E., 2000. PCR and specific antibodies to *Trypanosoma cruzi* in blood donors at the central blood bank from Centro Médico Nacional de Occidente (IMSS), Guadalajara, Jalisco, México. *Bioprotocol* 25, 99–104.

Lujan, C.D., Trifunell, M.F., Semba, A., Guerrero, C.F., Fletes, R.E., 2004. *Trypanosoma cruzi*: productive infection is not allowed by chorionic villous explant from normal human placenta in vitro. *Exp. Parasitol.* 108, 176–181.

Instituto Nacional de Geografía e Informática, 2000. Censo Nacional de Población y Vivienda, México. Available from: <<http://www.ssa.gob.mx>>.

Náida, L.V., Amato-Neto, V., Braz, L.M., Duarte, M.L., Umezawa, E.S., 1999. A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in São Paulo City, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 41, 305–311.

Olivera Mar, A., Guillén, O.F., Cruz, V.S., Hernández, B.N., Pérez, G.E., Córdoba, C.G., Reyes, P.A., Montoro, V.M., 2006. Serological and parasitological screening of *Trypanosoma cruzi* infection in mothers and newborns living in two Chagasic areas of México. *Arch. Med. Res.* 37, 774–777.

Ramsey, J.M., Ordóñez, R., Cruz-Celis, A., Alvear, A.L., Chavez, V., Lopez, R., Ponce, J.R., Gama, F., Carrillo, S., 2000. Distribution of domestic triatomine and stratification of Chagas Disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Med. Vet. Entomol.* 14, 19–30.

Rassi, A., Amato Neto, V., Rassi, G.G., Amato, V.S., Rassi Junior, A., Laqueti, A.O., Rassi, S.G., 2004. A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 485–489.

Russomando, G., Almíro, M., Candia, N., Franco, L., Sánchez, Z., de Guillén, I., 2005. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 49–54.

Schenone, H., Contreras, M.C., Borgolin, J.M., Matarana, R., Salinas, P., Sandoval, L., Rojas, A., Tello, P., Villarreal, F., 1991. Overview of the epidemiology of Chagas' disease in Chile. *Bol. Chil. Parasitol.* 46, 19–30.

Solana, M.E., Celentano, A.M., Tekiel, V., Jones, M., Gonzalez Cappa, S.M., 2002. *Trypanosoma cruzi*: effect of parasite subpopulation on marine pregnancy outcome. *J. Parasitol.* 88, 102–106.

Sosa-Estani, S., Gamboa-León, M.R., Del Cid-Lemus, J., Alzhebe, F., Alger, J., Almendares, O., Caffera, M.L., Chippaux, J.P., Dumontell, E., Gibbons, L., Padilla-Raygoza, N., Schneider, D., Bellizán, J.M., Buelkens, P., 2008. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 755–759.

Svoboda, M., Vireira, M., Truyens, C., Torrico, F., Carlier, Y., 2011. Molecular Approaches for Diagnosis of Chagas' disease and Genotyping of *Trypanosoma cruzi*. In: Plesing, D.H. (Ed.), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. ASM Press, Washington, pp. 713–725.

Thiermann, E., Muñoz, P., Lora, M., Arias, A., 1985. Congenital *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi* infections. *Rev. Chil. Pediatr.* 56, 143–150.

Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodríguez, P., Torrico, M.C., Dramalski, M., Truyens, C., Carlier, Y., 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 201–209.

Torrico, F., Alonso-Vega, C., Billo, C., Truyens, C., Carlier, Y., 2007. Relaciones materno-fetales en la infección con *T. cruzi* y la implementación de un programa nacional de detección y tratamiento de Chagas congénito en Bolivia. *Enf. Emerg.* 9, 9–16.

- Triquell, M.F., Diaz Lujan, C., Freilij, H., Paglini, P., Fretes, R.E., 2009. Placental infection by two subpopulations of *Trypanosoma cruzi* conditioned by differential survival of the parasite in deleterious placental medium and not by tissue reproduction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 1011–1018.
- Velasco, C.O., Valdespino, J.L., Tapia, C.R., Salvatierra, B., Guzmán, B.C., Magos, C., LLausa, A., Gutiérrez, G., Sepúlveda, J., 1992. Seroepidemiology of chagas disease in Mexico. *Sal. Pub. Mex.* 34, 186–196.
- Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y., Svoboda, M., 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 574–582.
- Zaidenberg, M., 1997. Congenital Chagas' disease in the province of Salta, Argentina, from 1980 to. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 32 (1999), 689–695.