

Caracterización molecular de los genes histona H2A y ARNsno-CI de *Trypanosoma rangeli*: aplicación en pruebas diagnósticas

Molecular characterization of histone H2A and snoRNA-CI genes of *Trypanosoma rangeli*: application in diagnostic tests

Paula Ximena Pavía¹, Claudia L. Cuervo¹, Juliana Gil¹, Ibeth Romero¹, Liliana Morales¹, Hugo Díez¹, Claudia Quintero², Patricia del Portillo³, Gustavo Adolfo Vallejo⁴, Astrid C. Florez⁵, Marleny Montilla⁵, Marcela Mercado², Miguel Vacca⁶, Rubén Santiago Nicholls⁵, Manuel C. López⁷, Concepción J. Puerta^{1*}

Resumen

La aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar e identificar *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* presenta a menudo dificultades de interpretación. Así, algunas pruebas generan la amplificación de bandas similares provenientes de uno de los dos parásitos, fragmentos polimórficos de un mismo parásito, o la prevalencia en la detección de *T. cruzi* en infecciones mixtas.

En este estudio se presentan y analizan los trabajos de investigación básica realizados con el objeto de diseñar y estandarizar pruebas de PCR específicas de cada parásito. Los iniciadores

Tch2AF/R se diseñaron sobre la base de la región diferencial observada entre las unidades génicas que contienen los genes *h2a* en estos tripanosomas. Esta pareja de iniciadores amplifican un fragmento de 234 pb específico para *T. cruzi* (cepas I y II). Los iniciadores TrF/R2 anillan en las regiones intergénicas del fragmento génico de 801 pb codificante para seis transcritos que forman la agrupación ARNsno-CI en *T. rangeli*. Estos iniciadores amplifican un fragmento de 620 pb exclusivo de las cepas KP1(-) y KP1(+) de este parásito.

La aplicación de estas PCR en vectores infectados y en pacientes con enfermedad de Chagas muestra que ambas pruebas constituyen herramientas útiles para el diagnóstico y la identificación diferencial de estos tripanosomátidos.

Palabras clave: histona, ARN nucleolar pe-

1 Laboratorio de Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

2 Unidad de Epidemiología, Departamento de Microbiología, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

3 Corporación Corpogen, Bogotá, D.C., Colombia.

4 Laboratorio de Investigaciones en Parasitología Tropical, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

5 Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá, D.C., Colombia.

6 Unidad de Cardiología. Hospital Universitario San Ignacio, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia.

7 Departamento de Biología Molecular, Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada, España.

Correspondencia:

Concepción Puerta B., Pontificia Universidad Javeriana, Carrera 7 No. 43-82, edificio 50, Laboratorio 113, Bogotá, D.C., Colombia.

Teléfono: (+571) 320-8320, extensión 4024; fax: (+571) 320-8320, extensión 4021.

cpuerta@javeriana.edu.co

Recibido: 14/05/2008; Aceptado: 05/03/2009

queño (ARNsno), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), *Trypanosoma*.

Abstract

The application of polymerase chain reaction (PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* often presents interpretation challenges. For example, some tests yield the amplification of similar bands from either parasite, polymorphic fragments of the same parasite, or present deviation towards *T. cruzi* in mixed infections.

In this study, the basic researching needed for designing and standardizing specific PCR tests for each parasite species PCR are shown and analyzed. The TcH2AF/R primers were designed on the basis of the differential gene region observed between the histone *h2a* genic units of these parasites. These primers amplify a specific 234 bp fragment in *T. cruzi* (*T. cruzi* I and II strains). The TrF/R2 primers anneal to the intergenic regions of an 801 bp gene fragment encoding for six transcripts that conform the snoRNA-Cl cluster in *T. rangeli*. These primers amplify a fragment of 620 bp exclusively in KP1(-) and KP1(+) strains of the parasite.

The application of these PCR tests in infected vectors and in chagasic patients show that both tests constitute useful tools for the diagnosis and differential identification of these trypanosomatids.

Key words: histone, RNA small nucleolar (snoRNA), polymerase chain reaction (PCR), *Trypanosoma*.

Introducción

El género *Trypanosoma* engloba a una serie de parásitos con características moleculares singulares que difieren considerablemente en cuan-

to a su capacidad patogénica para humanos. *Trypanosoma cruzi* es el agente causante de la enfermedad de Chagas, la cual afecta principalmente a Centroamérica y Suramérica, con 15 millones de personas infectadas en 21 países, 12.500 muertes anuales y una incidencia de 41.200 nuevos casos por año ⁽¹⁾.

Por otra parte, *Trypanosoma rangeli*, aun cuando carece de patogenicidad para el hombre, reviste una gran importancia por cuanto comparte vectores y reservorios con *T. cruzi*. Además, ambos tripanosomas presentan estadios morfológicos de desarrollo similares, son simpátricos y se presentan en infecciones mixtas tanto en vectores como en reservorios y humanos ⁽²⁾. Asimismo, estos parásitos poseen una elevada reactividad inmunológica cruzada ^(2,3). Además, algunas de las pruebas de PCR disponibles para la detección e identificación de estos parásitos presentan problemas tales como amplificación de bandas de tamaños similares en *T. cruzi* y *T. rangeli* ⁽⁴⁻⁶⁾, amplificación de fragmentos polimórficos ^(7, 8) y desviación de la prueba hacia *T. cruzi* en el caso de infecciones mixtas ⁽⁹⁻¹¹⁾ (tabla 1).

En resumen, todo ello contribuye a que el diagnóstico y el análisis epidemiológico de la enfermedad de Chagas se dificulten enormemente, especialmente en países como Colombia, donde *T. cruzi* comparte áreas endémicas con *T. rangeli* ^(2,3), lo que da lugar a la obtención de falsos positivos y falsos negativos. Es por ello que se hace necesario el desarrollo de nuevas opciones para la identificación específica de cada uno de estos parásitos. Dentro del anterior contexto, y con el fin de conseguir sistemas de diagnóstico diferenciales, se diseñaron y estandarizaron dos pruebas de PCR específicas para estos tripanosomas, tras la caracterización molecular de sus blancos de amplificación, la histona H2A y la agrupación génica codificante para los ARN nucleolares pequeños (ARNsno) Cl ⁽¹²⁻¹⁵⁾.

Tabla 1. Pruebas de PCR descritas para la identificación de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli*

Molécula blanco	Cebadores	Sensibilidad absoluta (fg de ADN)	T. cruzi, tamaño del fragmento (pb)	T. rangeli, Tamaño del fragmento (pb)	Material biológico ensayado Comentario adicional	Referencia
Región 3' no codificante de la unidad de 1,2 kb del gen <i>h2a</i>	TcH2AF TcH2AR	1	234	----	ADN desnudo Vectores natural y experimentalmente infectados Sangre humana	12-14
ARN nucleolares pequeños CI	TrF1 TrR2	1+	----	620	ADN desnudo Vectores natural y experimentalmente infectados	13,15
Minixión	S1629 S1630	400	600	860	ADN desnudo	8
Minixión	TC1-TC2 TC3 TR-ME	ND	250/200/150	100	ADN desnudo	16
Minixión	Tr INT 1 - 2	100	----	360	Vectores experimentalmente infectados Fragmentos polimórficos	7,17
Elemento repetido E13	O1- O2	1/30*	250	----	Sangre total	18,19
Gen 24s ARNr	D72-D75 RG3	5*	265/250	210	Vectores natural y experimentalmente infectados	6
Gen 24s ARNr	D71-D72	1/1000	110-125	> 250	Ácidos nucleicos totales***	20,21
Elemento repetitivo ADN P542	R1- R2	1/10	----	450	Vectores naturalmente infectados	11

Telómero	Tc 189Fw2 Tc189 Rv3 TrF3- TrRv6	1/20Tc* 1/4Tr*	100	170	Vectores natural y experimentalmente infectados Sangre humana de 1 paciente	22
Región amino-terminal Tc24	Tc24-T1 Tc24T2	ND	550	----	Sangre ratones infectados experimentalmente	23
ADN satélite 195 pb	TCZ1-TCZ2	1**	188	188	Sangre total Suero	24-26
Minicírculo	121- 122 - 119	0,1	330	ND	Sangre total	27,28
Minicírculo	S35-S36 KPL1	0,015**	330	760/450/300/165	Vectores naturalmente infectados Sangre humana	10,29
Minicírculo	TC1-TC2	ND	235	350/700	Vectores naturalmente infectados	9
Proteína flagelar	BP 1- BP2	10	692	615	Sangre total	5

+picogramos

*parásitos

** usando sondas internas

***RT-PCR

ND: datos no disponibles

En este trabajo se presentan las investigaciones llevadas a cabo conducentes a la obtención de estos sistemas de diagnóstico diferencial para *T. cruzi* y *T. rangeli*, así como un resumen de los resultados obtenidos en su aplicación a casos prácticos.

Caracterización molecular de los genes *h2a* en *T. rangeli*

Mediante ensayos de *Southern blot* del ADN genómico de las cepas H14 (KP1+) y C23 (KP1-) de *T. rangeli*, se determinó que el gen *h2a* se encuentra codificado por un solo tipo

de unidad con un tamaño de 800 pb, al menos, con 11 copias repetidas en tándem^(30,31), a diferencia de lo reportado en *T. cruzi*, parásito en el cual esta proteína está codificada en *locus* génicos que contienen unidades de diferente tamaño 0,76 y 1,2 kb (figuras 1A, 1B y 1C). Estas unidades génicas presentes en el genoma de *T. cruzi* difieren en la inserción del *short interspersed repeat element* (SIRE) en la región 3' no traducida de las unidades de 1,2 kb y dan origen a su vez a dos transcritos diferentes^(32,33).

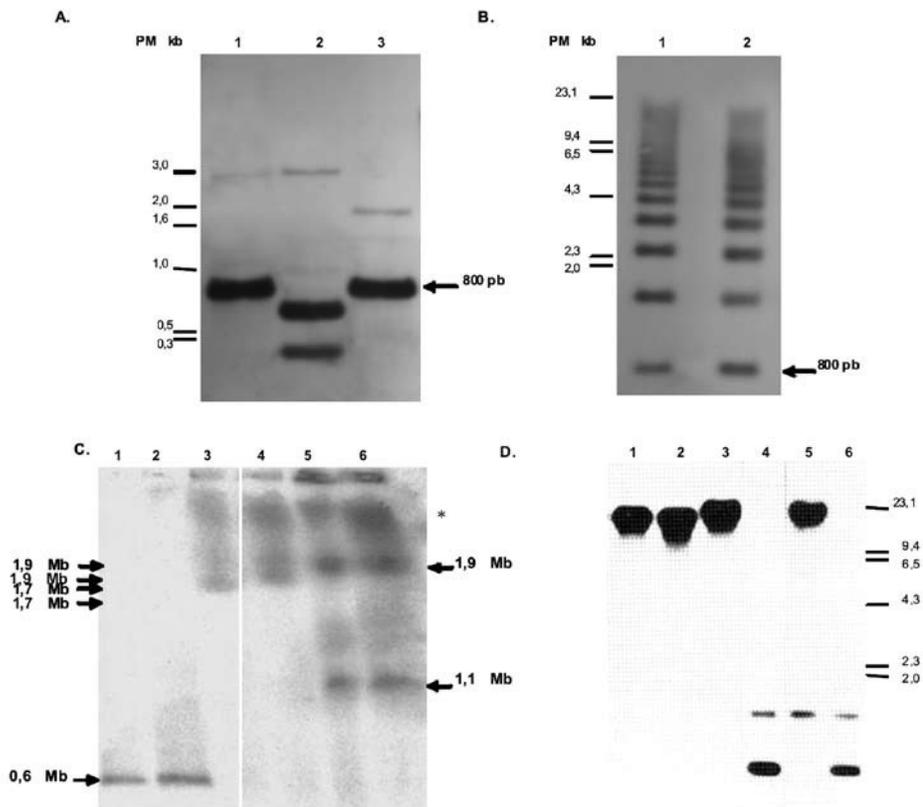


Figura 1 (A). Ensayo de *Southern blot* del ADN genómico de la cepa H14 de *T. rangeli*. Tres μg de ADN genómico de la cepa de *T. rangeli* fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *BglII* (1), *PvuII* (2) y *SphI* (3) corridos en geles de agarosa al 0,8%, transferidos los fragmentos obtenidos a un soporte sólido e hibridados con el clon C1 marcado con 32i-P. Los pesos del marcador molecular se indican a la derecha ⁽¹⁶⁾. **(B).** Ensayo de *Southern blot* del ADN genómico de la cepa H14 de *T. rangeli*. Tres μg de ADN genómico de la cepa de *T. rangeli* fueron parcialmente digeridos con las endonucleasas de restricción *SphI* y *BglII*, corridos en geles de agarosa al 0,8%, transferidos los fragmentos obtenidos a un soporte sólido e hibridados con el clon C1 marcado con 32i-P. Se utilizó λ -HindIII como marcador de peso molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda ⁽¹⁶⁾. **(C).** Ensayo de *Southern blot* del ADN genómico de la cepa Y de *T. cruzi*. Tres μg de ADN genómico fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *PstI* (1), *SacI* (2), *XbaI* (3), *NotI* (4), *KpnI* (5), y *StyI* (6) corridos en geles de agarosa al 0,8%, transferidos los fragmentos obtenidos a un soporte sólido e hibridados con el gen *h2a* de *Leishmania* marcado con 32i-P. Los pesos del marcador molecular se indican a la derecha ⁽¹⁹⁾. **(D).** Ensayo de electroforesis de campo pulsado de los cromosomas de diferentes cepas de *T. rangeli* y *T. cruzi*. Los cromosomas de las cepas *Shubacbarina* (1) y *Munantá* (2) de *T. cruzi*; de las cepas KP1(-) Tre (3) y 5048 (4) y de las cepas KP1(+) Choachí (5) y H14 (6) de *T. rangeli* fueron separados con pulsos de 250, 500, 750 y 1.000 segundos por un periodo de 96 horas a 84 voltios y 12°C. Después de visualizar los cromosomas con bromuro de etidio, éstos se transfirieron a un soporte sólido y se hibridaron con el clon C1 marcado con Pí-32. El tamaño de las bandas, en Mb, se indica a la izquierda y la derecha de la figura ⁽³⁰⁾.

Los estudios de electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) para los genes *h2a* de *T. rangeli* indican que estos genes se localizan en las cepas KP1(-) en dos cromosomas de 1,7 y 1,9 Mb, y en las cepas KP1(+) en los cromosomas de 1,1 y 1,9 Mb, aproximadamente

(figura 1D). Estudios similares de PFGE, previamente realizados en *T. cruzi*, muestran que los genes *h2a* presentan, entre cepas, una gran variabilidad en su localización cromosómica, incluso entre aquéllas pertenecientes a un mismo grupo taxonómico ⁽³⁴⁾. Por lo tan-

to, la localización cromosómica de dicho gen en *T. rangeli* es ya una herramienta útil como marcador diferencial entre los grupos (KP1+) y (KP1-) de dicho parásito, hecho que representa una diferenciación con *T. cruzi*.

Los análisis de la secuencia de nucleótidos a partir de fragmentos generados por digestión de una segunda biblioteca del ADN genómico del parásito *T. rangeli* en la cepa C23 (KP1-) o de amplificación en la cepa H14 (KP1+), mostraron que el gen *h2a* en la cepa H14 está conformado por 799 pb, de las cuales, 408 pb se corresponden con la región codificante. Dicha región presenta una identidad de 99,5% con la misma región de la cepa C23 (presentándose las diferencias a nivel del tercer nucleótido del codón), de 90% con la región de ambas unidades de *T. cruzi* y de 80% con la de *T. brucei*.

La secuencia deducida de aminoácidos del gen *h2a* de la cepa H14 de *T. rangeli* mostró 100% de identidad al compararla con dicha proteína para la cepa C23^(30,31). Dicha proteína presenta los motivos consenso AGLXFPV, RSAK y la histidina en la posición 123, característicos de las histonas H2A y presentes también en la secuencia de la histona H2A de *T. cruzi*⁽³³⁾. Sin embargo, las regiones 5' y 3' no codificantes del gen *h2a* de la cepa H14, constituidas por 148 pb y 243 pb, respectivamente, presentan un 95% de identidad con su homóloga en C23 y 58% y 69% de identidad con las mismas regiones de las unidades génicas de 0,76 y 1,2 kb de la proteína histona H2A de *T. cruzi*.

En resumen, estos resultados demuestran que no existen diferencias significativas en cuanto a la organización genómica del gen *h2a* más allá de las diferencias previamente reportadas entre las cepas C23⁽³¹⁾ y H14⁽³⁰⁾, pero existe una clara diferencia en su localiza-

ción cromosómica, que se extiende a otras cepas del parásito y permite diferenciar entre los grupos de *T. rangeli* (KP1+ y KP1-). Igualmente, no se encontraron diferencias a nivel de la secuencia de aminoácidos entre las cepas C23 KP1(-) y H14 KP1(+), únicamente se detectaron divergencias a nivel de la tercera posición del codón de traducción. Dicha conservación, para la secuencia de aminoácidos de la proteína histona H2A, entre los grupos de *T. rangeli* se explica por la gran conservación evolutiva y función biológica que cumplen estas proteínas en la organización y función del ADN dentro de la célula eucariota⁽³⁵⁾. Sin embargo, sí observamos diferencias en las regiones intergénicas, entre los grupos de *T. rangeli* (KP1+ y KP1-), diferencias que se hacen más acusadas al compararse con aquéllas que portan los genes *h2a* de *T. cruzi*.

Caracterización molecular de la agrupación génica ARNsno-CI en *T. rangeli*

A partir de una segunda biblioteca genómica de la cepa C23 [KP1(-)] de *T. rangeli*, construida en el sitio *NotI* del plásmido pBS (Stratagene) y enriquecida en fragmentos de 1,0 kb, se aisló el clon CI1. Los ensayos de *Southern blot* a partir de ADN genómico del parásito demostraron que CI1 se encuentra en el genoma de *T. rangeli* como una unidad de repetición de 800 pb, organizada en tándem y localizada en un cromosoma de 1 Mb (figuras 2A, 2B y 2C)⁽¹⁵⁾.

Para confirmar la transcripción de CI1, se realizó un ensayo de *Northern blot* a partir del ARN total de formas epimastigotas del parásito, encontrándose un transcrito, aproximadamente, de 90 nts en *T. rangeli*, ausente en *T. cruzi* (figura 2D)⁽¹⁵⁾.

Los análisis *in silico* de CI1 mediante los programas Clustal W⁽³⁶⁾ y L-ALIGN⁽³⁷⁾ identificaron un total de seis ARNsno, tres de ellos co-

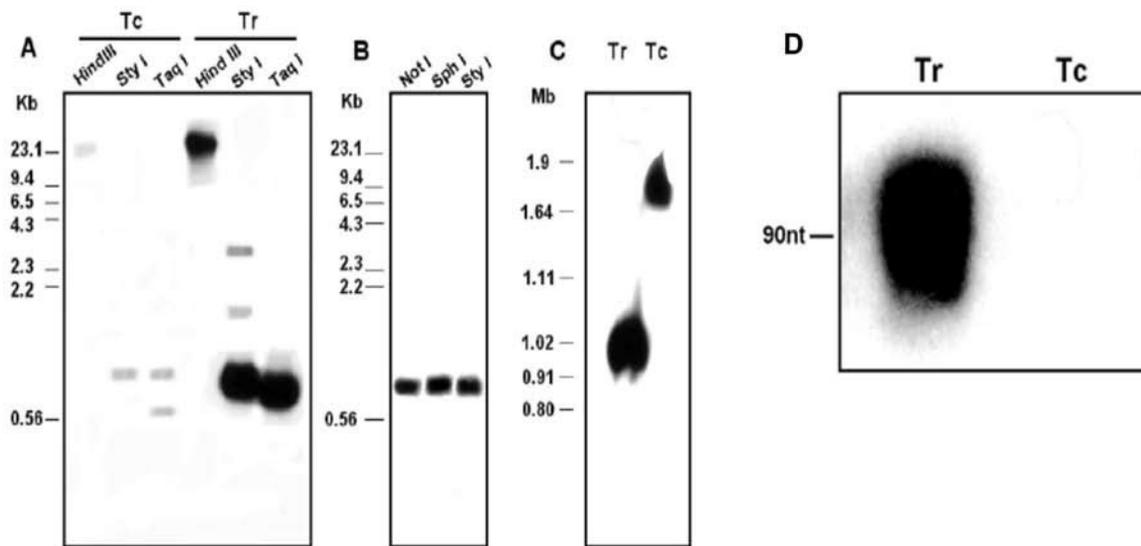


Figura 2. Organización genómica del clon C11 de *T. rangeli*. Análisis de *Southern blot* de ADN genómico y cromosomas de formas epimastigotas de la cepa C23 de *T. rangeli* y de la cepa No. 3 de *T. cruzi*, hibridados con C11 marcado radiactivamente. **(A).** Cuatro μg de ADN de *T. cruzi* y 2 μg de ADN de *T. rangeli* fueron digeridos con las endonucleasas señaladas, corridos en geles de agarosa al 0,8%, transferidos los fragmentos obtenidos a un soporte sólido e hibridados con C11. Se utilizó λ HindIII como marcador de tamaño molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda. Nótese la diferencia existente en la intensidad de las señales obtenidas entre las dos especies de parásitos versus la cantidad de ADN usada en el ensayo. **(B).** Un μg de ADN de *T. rangeli* fue digerido con las endonucleasas señaladas, corrido en geles de agarosa al 0,8%, transferido los fragmentos obtenidos a un soporte sólido e hibridado con C11. Se utilizó λ HindIII como marcador de tamaño molecular, cuyos pesos se indican a la izquierda. Nótese que se obtiene una banda de hibridación del mismo tamaño con las enzimas empleadas, patrón característico de los genes repetidos en tándem cuando se digieren con endonucleasas que cortan el gen de manera interna una sola vez. **(C).** Electroforesis en campo pulsado de los cromosomas de la cepa C23 de *T. rangeli* (Tr) y de la cepa Y de *T. cruzi* (Tc). Los números a la izquierda indican el corrido del patrón de tamaño molecular, cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae*. **(D).** Análisis de *Northern blot* de ARN total de formas epimastigotas de la cepa C23 de *T. rangeli* (Tr) y de *T. cruzi* (Tc) en fase logarítmica de crecimiento, hibridados con el clon C11 marcado radiactivamente ⁽¹⁵⁾.

dificantes para cada una de las familias C/D y H/ACA (figura 3). Por otra parte, el análisis de homología de la secuencia de nucleótidos del fragmento C11 en la cepa H14, KP1(+) mostró 96,5% de identidad con su contraparte en la cepa C23 KP1(-) de *T. rangeli* ⁽³⁸⁾. Esta gran homología de secuencia puede obedecer a que tanto las regiones codificantes de esta agrupación como las espaciadores intergénicas están

sometidas a presión evolutiva para conservar su secuencia y su longitud, de forma tal que ocurra el correcto procesamiento de cada uno de los ARNsno.

Es llamativo que se han encontrado genes ortólogos codificantes para estos ARNsno en el cromosoma 11 de *T. brucei*, en donde se encuentran conformando una agrupación que se

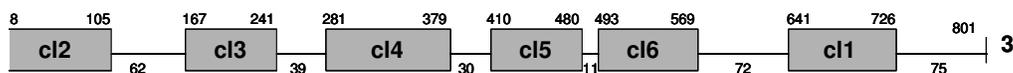


Figura 3. Representación esquemática de la agrupación génica C1 de *T. rangeli*. Las cajas representan la región codificante para cada uno de los ARNsno. Los números representan la posición de los nucleótidos en la agrupación ⁽³⁹⁾.

repite 3,5 veces, encargada de modificar varias posiciones en el ARNr (tabla 2). Además, los análisis basados en las secuencias reportadas en los diferentes proyectos genomas de *T. cruzi* y *Leishmania major*, ponen de manifiesto la presencia de estos ARNsno en ambos parásitos.

Retomando los resultados de la figura 2D, en la cual se observa una única banda de hibri-

dación de 90 nt, aproximadamente, al hibridar el fragmento CI1 con el ARN de *T. rangeli*, es probable que en la misma se encuentren representados los seis ARNsno homólogos a CI1, puede deberse a las elevadas condiciones de astringencia usadas en el ensayo de *Northern blot* y al uso del inserto del clon CI1 entero como sonda de hibridación ⁽¹⁵⁾.

Tabla 2. Comparación de los ARNsno de *Trypanosoma rangeli* con sus ortólogos en tripanosomátidos

ARNsno <i>T. rangeli</i>	Ortólogo tripanosomátidos			
	Nombre	Especie	Tamaño (nts)	Identidad (%)
CI1 (86)	TC11C4C1	<i>T. cruzi</i>	87	80,2
	TB11Cs4C1	<i>T. brucei</i>	89	73,3
	G2	<i>L. collosoma</i>	84	78,8
	LM27C1C1	<i>L. major</i>	88	70,6
CI2 (88)	TC11C4C2	<i>T. cruzi</i>	87	88,5
	TB11Cs4C2	<i>T. brucei</i>	96	85,4
	TS1	<i>L. collosoma</i>	91	71,4
CI3 (75)	LM27C1C2	<i>L. major</i>	88	60,0
	TC11C4H1	<i>T. cruzi</i>	73	85-88
	TB11Cs4H1	<i>T. brucei</i>	74	71,4
CI4 (99)	LM27Cs1H1	<i>L. major</i>	66	77,3
	TC11C4C3	<i>T. cruzi</i>	90	83,7
	TB11Cs4C3	<i>T. brucei</i>	101	64,0
	TS2	<i>L. collosoma</i>	99	72,4
CI5 (71)	LM27C1C3	<i>L. major</i>	89	71,3
	TC11C4H2	<i>T. cruzi</i>	69	79,7
	TB11Cs4H2	<i>T. brucei</i>	69	76,2
CI6 (77)	LM27Cs1H3	<i>L. major</i>	69	74,2
	TC11C4H3	<i>T. cruzi</i>	72	88,9
	TB11Cs4H3	<i>T. brucei</i>	78	74,3
	H6	<i>L. collosoma</i>	69	62,5
	LM27Cs1H2	<i>L. major</i>	66	64,8

Adaptado de ⁽³⁹⁾.

Las secuencias de los ARNsno en *T. rangeli*, presentan, en líneas generales, una mayor identidad con sus ortólogos en *T. cruzi* que en *T. brucei*, tal como sucede para los genes codificantes para las proteínas KMP-11⁽⁴⁰⁾, histona H2A⁽¹⁷⁾ y HSP70⁽⁴¹⁾.

Este hecho sustenta, en general, una mayor cercanía evolutiva de *T. rangeli* con *T. cruzi* y no con *T. brucei*, a pesar de que tanto *T. rangeli* como *T. brucei* se transmiten mediante la saliva del insecto vector (sección Salivaria), a diferencia de *T. cruzi* que se transmite por las heces (sección Stercoraria). Además, estos resultados ilustran la utilidad de *T. rangeli* como modelo de estudio de *T. cruzi*. ARNsno.

Detección específica de *T. rangeli* mediante una prueba de PCR basada en la agrupación génica ARNsno-CI

Sobre la base de los estudios realizados, anteriormente resumidos, que permitieron identificar zonas divergentes entre los transcritos ARNsno-CI de *T. rangeli* y *T. cruzi*, se procedió al diseño de oligonucleótidos complementarios específicos de *T. rangeli*. Así, se sintetizaron los iniciadores TrF/TrR2, los cuales amplifican un fragmento de 620 pb a partir del ADN de *T. rangeli*, tanto de cepas KP1(+) como KP1(-), con una sensibilidad de 1 pg de ADN en la presencia de ADN heterólogo humano, lo cual equivale al ADN de 5 parásitos (figura 4). Como cabía de esperar sobre la base del diseño realizado, se obtuvo una gran especificidad de la prueba, por cuanto no se presentó amplificación con el ADN de ninguna de las cepas de *T. cruzi* estudiadas, pertenecientes a los distintos grupos o zimodemas de dicho parásito⁽¹⁵⁾.

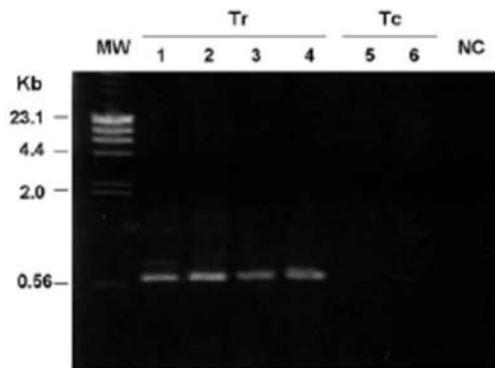


Figura 4. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% coloreado con bromuro de etidio que contiene 10 µl del producto de la PCR TrF/R2 obtenido de los ADN de las cepas de *T. rangeli*, 5048 (1), H14 (2), C23 (3), Tre (4) y de *T. cruzi*, *Shubacbarina* (5) e Y (6). En el control negativo (NC) se usó agua destilada como templado. ADN del fago λ digerido con *HindIII* (Promega) se usó como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda⁽¹⁵⁾.

Detección específica de *T. cruzi* mediante una prueba de PCR basada en los genes histona H2A y el elemento SIRE

Con base en el elemento repetido SIRE presente en la región 3' no codificante de los genes *h2a*, se diseñaron y sintetizaron los cebadores TcH2AF y TcH2AR, los cuales amplifican un fragmento de 234 pb en cepas pertenecientes a los

grupos *T. cruzi* I y *T. cruzi* II y al zimodema III, con una sensibilidad de 1 fg aun en la presencia de ADN heterólogo (figura 5). No se observa amplificación de ningún fragmento al usar como molde, en la prueba de PCR, el ADN de los grupos 1 y 2 de *T. rangeli*, como tampoco con ADN de otros tripanosomátidos, de humano, de ratón ni del insecto vector *Rhodnius prolixus*⁽¹⁴⁾.

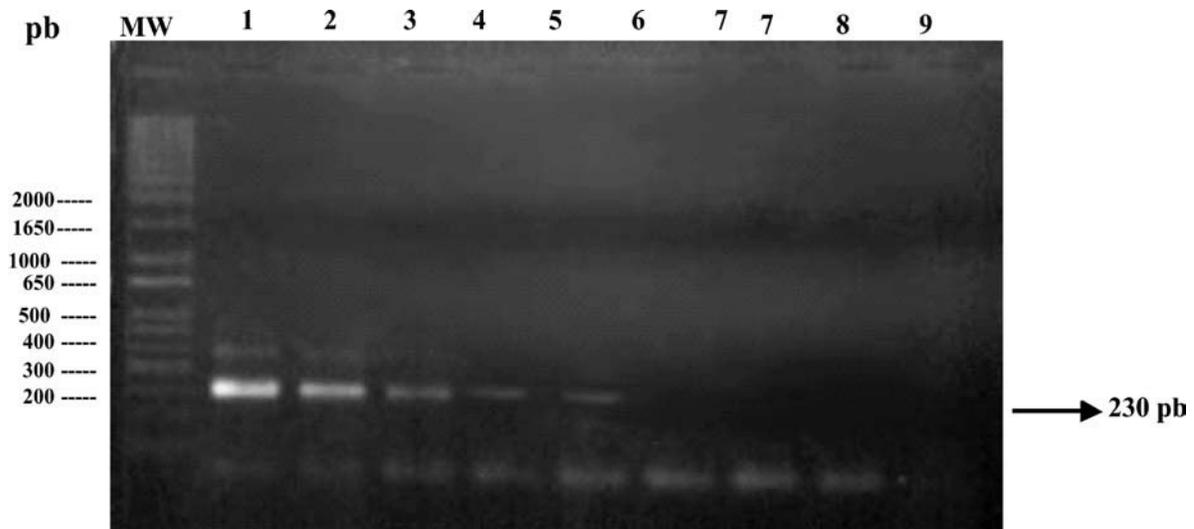


Figura 5. Determinación de la sensibilidad *in vitro* con ADN desnudo del parásito. Electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1,5% coloreado con bromuro de etidio que contiene 10 μ l del producto de PCR usando como molde cantidades decrecientes del ADN de la cepa BM López de *T. cruzi*: 10 pg (1), 1 pg (2), 100 fg (3), 10 fg (4), 1 fg (5), 0,1 fg (6), 0,01 fg (7), 0,001 fg (8) y en el control negativo (9), se usó agua destilada como templado. 1 kb Plus (Invitrogen) se usó como marcador; los tamaños de sus fragmentos se indican a la izquierda ⁽¹⁴⁾.

Detección diferencial de ambos tripanosomas en vectores comunes

La detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en vectores naturalmente infectados ha sido objeto de estudio debido a que en las infecciones intestinales existen flagelados indistinguibles entre sí, de manera que en algunas infecciones se identifica la presencia de una de las dos especies, pero no se puede confirmar o descartar la presencia de la otra ⁽⁴²⁾.

Dentro de este contexto, en este trabajo se evaluó el uso de las pruebas de PCR usando los iniciadores TcH2AF/R y TrF/R2 específicos de *T. cruzi* y *T. rangeli*, respectivamente, así como el estudio comparativo con los iniciadores S35/S36 que amplifican el ADN del cinetoplasto (ADNk) ⁽²⁹⁾. Se realizaron infecciones experimentales de ninfas de quinto estadio de *R. prolixus* sanos mantenidos en el laboratorio. De ellas, 14 especímenes fueron infectados con *T. cruzi*, 22 con *T. rangeli* y 17 con ambos tripanosomas. Se utilizaron como controles 40

insectos vectores libres de infección, los cuales fueron distribuidos proporcionalmente para cada uno de los ensayos.

Cada insecto fue expuesto a luz ultravioleta (UV) durante 1 hora, disecado 15 días después de la infección para obtener el contenido intestinal, las heces y la hemolinfa y 45 días después de la infección para obtener muestras de glándulas salivales. Las muestras se analizaron por observación directa al microscopio, coloración con Giemsa y las tres mencionadas pruebas de PCR.

Para el caso de las infecciones individuales con *T. cruzi*, la presencia de formas parasitarias 15 días después de la infección se detectó por observación directa al microscopio y coloración de Giemsa en un porcentaje de 100% (14 de 14) y 78% (11 de 14), respectivamente. Con las PCR TcH2AF/R y S35/S36 se detectó la presencia de *T. cruzi* en 100% (14 de 14) con los productos de amplificación esperados. El índice de correlación kappa en-

tre las dos pruebas de PCR fue de 1 (IC95% 0,95-1,0), lo cual se interpretó como concordancia casi perfecta ⁽⁴³⁾. Teniendo en cuenta que Pavía *et al.* ⁽¹⁴⁾, reportan que la prueba de PCR TcH2AF/R puede detectar hasta 1/200 del contenido de ADN de un parásito aun en la presencia de ADN heterólogo humano o de ratón, esta PCR puede considerarse como una de las pruebas con mayor poder de detección en insectos vectores entre las que utilizan ADN nuclear como blanco de amplificación.

Por otro lado, en las infecciones experimentales individuales con *T. rangeli*, la presencia de formas parasitarias en la hemolinfa 15 días después de la infección, fue detectada mediante observación directa al microscopio y coloración de Giemsa en el 100% (22 de 22). La presencia de *T. rangeli* también se detectó en la hemolinfa con ambas pruebas de PCR (22 de 22) en 100% con los productos de amplificación esperados al usar en este caso como iniciadores las parejas TrF/R2 y S35/S36. El índice de correlación kappa entre ambas pruebas fue de 1 (IC95% 0,95-1,0), lo cual se interpretó como concordancia casi perfecta ⁽⁴³⁾. Por su parte, los insectos no infectados fueron negativos para todas las pruebas aplicadas.

Cuarenta y cinco días después de la infección, 21 de los 22 vectores infectados con *T. rangeli* y 3 controles fueron descontaminados y disecados, y se extrajeron las glándulas salivales. Las formas parasitarias se detectaron por observación directa al microscopio y coloración de Giemsa en un porcentaje de 90% (19 de 21) y 67% (14 de 21), respectivamente. Con la PCR TrF/R2 se detectó la presencia de *T. rangeli* en 33% (7 de 21) de los vectores y con la PCR S35-S36 en 48% (10 de 21).

El índice de correlación kappa entre las dos pruebas de PCR fue del 0,76, lo cual se interpretó como una buena concordancia (IC

95%: 0,52-0,90) siguiendo los criterios descritos por Sackett *et al.* ⁽⁴³⁾. Todos los casos de insectos positivos (presencia de parásitos) por PCR fueron igualmente positivos por las pruebas convencionales. Por su parte, los cinco controles sanos fueron negativos para todas las pruebas aplicadas. Estos resultados evidencian una baja sensibilidad de ambas pruebas de PCR para detectar la presencia de *T. rangeli* en glándulas salivales en comparación con los métodos convencionales, hecho que puede atribuirse a la presencia de inhibidores de la reacción de PCR (no se presentan los datos).

En resumen, los resultados obtenidos muestran que el poder de detección de infecciones individuales en insectos vectores mediante la prueba de PCR usando los iniciadores TrF/R2, es menor en relación con la utilización de la pareja de cebadores S35/S36. Sin embargo, en las infecciones mixtas experimentales con ambos parásitos, *T. rangeli* fue detectado en el contenido intestinal y heces de los insectos en 71% con los iniciadores TrF/R2 y sólo en 6% con los cebadores S35/S36. Estos resultados corroboran lo descrito por Vallejo *et al.* ⁽¹⁰⁾, y Vargas *et al.* ⁽¹¹⁾, quienes observaron que el perfil de amplificación de *T. cruzi* con los cebadores S35/S36 es dominante en la mayoría de las infecciones mixtas (*T. rangeli* y *T. cruzi*), debido probablemente a que los micicrulos de *T. cruzi* son más abundantes y consecuentemente compiten más enérgicamente por el anillamiento con los iniciadores, lo cual genera un perfil típico de *T. cruzi* que enmascara la presencia de *T. rangeli*. Por lo tanto, estos hallazgos claramente demuestran la utilidad de la prueba de PCR TrF/R2 para detectar la presencia de ambos tripanosomas en insectos coinfectados.

Una vez comprobada la capacidad de detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en insectos vectores experimentalmente infectados mediante PCR

usando las parejas de cebadores TcH2AF/R y TrF/R2, respectivamente, se evaluó la capacidad de dichas pruebas para la detección de los mencionados parásitos en vectores naturalmente infectados.

Es así como se analizaron un grupo de *R. colombiensis*, recolectados en el municipio de Coyaima (Tolima) de palmas *Attalea butyracea*, y otro grupo de *T. maculata* del departamento de Bolívar. En los 29 *R. colombiensis*, las formas parasitarias en el contenido intestinal y heces se detectaron por observación directa al microscopio y coloración de Giemsa en un porcentaje de 83% (23 de 29) y 86% (25 de 29), respectivamente; mientras que en glándulas salivales no se observaron formas parasitarias. Se detectó la presencia de *T. cruzi* en el contenido intestinal y heces en 100% (29 de 29) con ambas pruebas de PCR. Sin embargo, *T. rangeli* se detectó en el contenido intestinal y heces con la PCR TrF/R2 en 14% (4 de 29) y en 10% (3 de 29) con la PCR S35/S36. Además, este parásito no se detectó con ninguna de las pruebas de PCR utilizadas en las 8 muestras de glándulas salivales analizadas, a pesar de que tres de ellas fueron positivas en heces mediante la técnica de observación directa al microscopio y coloración de Giemsa.

Por otra parte, las 8 muestras de glándulas salivales analizadas de *R. colombiensis* fueron negativas, tanto por las pruebas de PCR como por los métodos convencionales, lo cual sugiere que en el momento de su análisis el parásito no había invadido las glándulas salivales de los insectos. Por otra parte, dado que los 21 ejemplares de *T. maculata* recolectados en Bolívar fueron negativos para *T. cruzi* y *T. rangeli* con los iniciadores TcH2AF/R y TrF/R2, se confirmó una vez más la especificidad de estas pruebas de PCR, teniendo en cuenta que las pruebas convencionales de identificación y

la PCR S35-S36⁽¹⁰⁾ también fueron negativas para estos insectos.

Los resultados mostrados evidencian que las pruebas de PCR, basadas en los fragmentos génicos *h2a* y el elemento SIRE (TcH2AF/R) y el ARNsno-C1 (TrF/R2), usadas para la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli*, respectivamente, reúnen las condiciones adecuadas para utilizarse en la detección de infecciones puras y mixtas en triatomos naturalmente infectados por estos parásitos. Por lo tanto, estas pruebas constituyen una valiosa herramienta en el estudio y control epidemiológico de la enfermedad de Chagas.

Detección de *T. cruzi* en humanos

Aun cuando se han descrito varias pruebas de PCR para la identificación de este parásito, pocas han reportado resultados exitosos en muestras humanas (tabla 1). De éstas, vale la pena mencionar las que utilizan como blanco de amplificación ADN satelital y ADNk del parásito, las cuales, si bien presentan un buen desempeño y sensibilidad en infecciones crónicas y congénitas⁽⁴⁴⁻⁴⁶⁾, tienen la desventaja de amplificar fragmentos de tamaño similar en *T. rangeli*.

Con el objeto de evaluar la validez de la prueba de PCR TcH2AF/R para el diagnóstico de *T. cruzi* en muestras humanas, se realizó un estudio de concordancia de la misma con las pruebas clásicas de inmunoensayo enzimático e inmunofluorescencia indirecta, determinando la sensibilidad y especificidad de la mencionada prueba de PCR. A tal fin se clasificaron y examinaron 156 individuos según los hallazgos clínicos y epidemiológicos y los resultados de las pruebas serológicas. Además, 97 de las 156 muestras se compararon con la PCR S35/S36. Los resultados obtenidos mostraron que de las 156 muestras, 89 (57%) fueron positivas

por IFI y ELISA, de las cuales, 84 (53,8%) presentaron el perfil de amplificación correspondiente a la banda esperada de 234 pb al usar los cebadores TcH2AF/R, obteniéndose una sensibilidad de 88% (IC95%: 75%-95%) y especificidad de 92,5% (IC95%: 87,7%-97,2%). El índice kappa, indicador de concordancia entre las pruebas serológicas y TcH2AF/R fue de 0,8 (IC95% 0,73-0,86), en tanto que entre las PCR TcH2AF/R y S35/S36 fue de 0,9 (IC95% 0,84-0,96). Por consiguiente, estos resultados permiten concluir que la prueba de PCR TcH2AF/R es una prueba diagnóstica promisoría complementaria a las pruebas serológicas, para la detección de *T. cruzi*.

Las pruebas de PCR aquí descritas, TcH2AF/R y TRF/R, usadas en conjunto permiten la identificación de infecciones mixtas por ambas especies de tripanosomas, tanto en hospederos vertebrados como invertebrados, de manera que constituyen una ayuda diagnóstica importante para la correcta identificación de estos parásitos en las áreas endémicas en donde circulan ambos tripanosomas. Además, estos iniciadores, al anillar a blancos nucleares y ser usadas junto con pruebas más sensibles que amplifican blancos mitocondriales como la PCR S36/S36, pueden confirmar la presencia del parásito y determinar de forma temprana el aumento en carga parasitaria.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento a Pedro Blanco, de la Universidad de Sucre, por el suministro de los especímenes de *Triatoma maculata* y a la Unidad de Electrofisiología y Cardiología del Hospital Universitario San Ignacio (HUSI), a la Fundación Clínica Abood Shaio y al Centro de Salud del municipio de Santana, departamento de Boyacá.

Financiación

Estos estudios fueron financiados por la Vicerrectoría Académica de la Pontificia Universidad Javeriana, proyectos N° 001394, 001746, 000452 y 000481 y la Fundación para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología del Banco de la República, proyectos N° 851 y 1.389. Además, se recibió apoyo para un Joven Investigador por parte de Colciencias y la Pontificia Universidad Javeriana, Convenio Especial 031-2002.

Referencias

1. Guhl F, Lazdins-Helds JK, editores. Reporte sobre la enfermedad de Chagas, Grupo de trabajo científico. :Geneva: World Health Organization; 2007. p. 1-96.
2. Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2003;98:435-42.
3. D' Alessandro A, Saravia N. *Trypanosoma rangeli*. En: Gilles HM, editor. Protozoal Diseases. Oxford, UK: Oxford University Press Inc.; 1999. p. 398-412.
4. Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. Arch Med Res. 2002; 33:362-70.
5. Silber AM, Bua J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. Exp Parasitol. 1997;85:225-32.
6. Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. Exp Parasitol. 1999;91:306-14.
7. Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. Parasitology. 1999;118:375-82.
8. Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. Mol Cell Probes. 1992;6:237-243.
9. Dorn PL, Engelke D, Rodas A, Rosales R, Melgar S, Brahney B, et al. Utility of the polymerase chain reaction in detection of *Trypanosoma cruzi* in Guatemalan Chagas' disease vectors. Am J Trop Med Hyg. 1999;60:740-5.
10. Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species-specific

- ic detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop*. 1999;72:203-12.
11. Vargas N, Souto RP, Carranza JC, Vallejo GA, Zingales B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. *Exp Parasitol*. 2000;96:147-59.
 12. Gil J, Pavia P, Montilla M, Florez AC, Quintero C, Mercado MM, Vacca M, Nicholls S, Puerta C. Comparación de una prueba de PCR basada en los genes codificantes para la histona H2A con pruebas serológicas convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica en pacientes colombianos. *Biomedica*. 2007;27(Supl.1):83-91.
 13. Pavia P, Vallejo GA, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the son-RNA-Cl1 genes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2007;49:23-30.
 14. Pavia P, Cuervo CL, Montilla M, Nicholls RS, Puerta C. Diseño y estandarización de una prueba de PCR para la detección específica de *Trypanosoma cruzi*. *Infectio*. 2003;7:129-36.
 15. Morales L, Romero I, Diez H, Del Portillo P, Montilla M, Nicholls S, Puerta C. Characterization of a candidate *Trypanosoma rangeli* small nucleolar RNA gene and its application in a PCR-based parasite detection. *Exp Parasitol*. 2002;102:72-80.
 16. Fernandes O, Santos SS, Cupolillo E, Mendonça B, Derre R, Junqueira AC, et al. A mini-exon multiplex polymerase chain reaction to distinguish the major groups of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:97-9.
 17. Machado EM, Alvarenga NJ, Romanha AJ, Grisard EC. A simplified method for sample collection and DNA isolation for polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2000;95:863-6.
 18. Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol*. 1992; 51:271-80.
 19. Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Omelianiuk M, Guzmán S, Moreno Barral J, et al. Risk progression to chronic Chagas' cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart*. 2003;89:1186-90.
 20. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62:45-52.
 21. Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;58:807-11.
 22. Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:775-9.
 23. Taibi A, Guevara-Espinoza A, Schöneck R, Yahiaoui B, Ouaisi A. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology*. 1995;111:581-90.
 24. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1477-82.
 25. Breniere SF, Bosseno MF, Barnabe C, Urdaneta-Morales S, Tibayrenc M. Copy number differences in the 195 bp repeated satellite DNA from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: potential use for epidemiologic surveys. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88:163-5.
 26. Russomando G, De Tomassone MM, De Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg*. 1998;59:487-91.
 27. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51:771-7.
 28. Lages-Silva E, Crema E, Ramirez LE, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg*. 2001;65:435-41.
 29. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33:205-14.
 30. Cuervo C, López MC, Puerta C. The *Trypanosoma rangeli* histone H2A gene sequence serves as a differential marker for KP1 strains. *Infect Genet Evol*. 2006;6:401-9.
 31. Puerta C, Cuervo P, Thomas MC, López MC. Molecular characterization of the histone H2A gene from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitol Res*. 2000;86:916-22.
 32. Marañón C, Thomas MC, Puerta C, Alonso C, López MC. The stability and maturation of the H2A histone mRNAs from *Trypanosoma cruzi* are implicated in their post-transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1490:1-10.

33. Puerta C, Martin J, Alonso C, López MC. Isolation and characterization of the gene encoding histone H2A from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;64:1-10.
34. Thomas MC, Olivares M, Escalante M, Marañón C, Montilla M, Nicholls S, *et al*. Plasticity of the histone H2A genes in a Brazilian and six Colombian strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2000;75:203-10.
35. Galanti N, Galindo M, Sabaj V, Espinoza I, Toro GC. Histone genes in trypanosomatids. *Parasitol Today*. 1998;14:64-70.
36. Corpet F. Multiple sequence alignment which hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:10881-90.
37. Huang XQ, Hardison RC, Miller W. A space-efficient algorithm for local similarities. *Comput Appl Biosci*. 1990;6:373-81.
38. Gómez C, Nocua P, Cuervo C, Puerta CJ. Amplificación, clonación y secuenciación de la agrupación génica CI que codifica para ARN nucleolares pequeños en la cepa H14, KP1(+) de *Trypanosoma rangeli* (tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2007.
39. Puerta CJ. Identificación de una agrupación génica que codifica para ARN pequeños de nucleolo en *Trypanosoma rangeli*. *Infectio*. 2005;9:171-9.
40. Díez H, Thomas MC, Uruña CP, Santander SP, Cuervo CL, López MC, *et al*. Molecular characterization of the kinetoplast membrane protein-11 genes from the parasite *Trypanosoma rangeli*. *Parasitology*. 2005;130:643-51.
41. Cuervo CL, Mayorga DC, Pavia P, López MC, Puerta C. Caracterización parcial de los genes codificantes para la proteína de choque térmico HSP70 de *Trypanosoma rangeli*. *Infectio*. 2004;8:268-78.
42. Vallejo GA, Marinkelle CJ, Guhl F, De Sánchez N. Comportamiento de la infección y diferenciación morfológica entre *Trypanosoma cruzi* y *T. rangeli* en el intestino del vector *Rhodnius prolixus*. *Rev Bras Biol*. 1988;48:577-87.
43. Sackett DL, Haynes RB, Guyatt GH, Tugwell P. Selección de pruebas diagnósticas. En: *Epidemiología Clínica, Ciencia Básica para la Medicina*, 2^{da} ed. México DF, México: Editorial Médica Panamericana; 1998. p. 64-7.
44. Fitzwater S, Calderon M, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, Verastegui M, *et al*. Polymerase chain reaction for chronic *Trypanosoma cruzi* infection yields higher sensitivity in blood clot than buffy coat or whole blood specimens. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;79:768-70.
45. Benvenuti LA, Rogério A, Freitas HF, Mansur AJ, Fiorelli A, Higuchi ML. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Ann Trop Med parasitol*. 2008;102:481-7.
46. Díez CN, Manattini S, Zanuttini JC, Bottasso O, Marcipar I. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2008;78:624-7.