

Artículos Originales //

Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado

Antonio Morocoima^{1,2}, Enma J. Tineo Brito^{2,3}, Elizabeth Ferrer^{4,5*}, Leidi Herrera⁶ & Melida Nuñez³

Se describe un caso agudo de enfermedad de Chagas en un preescolar de sexo masculino, de 6 años de edad, procedente del caserío Las Lajas, municipio Sotillo, estado Anzoátegui, Venezuela. Clínicamente, a la inspección y palpación, presentó eritema y edema bipalpebral derecho, con adenomegalia y nódulo satélite que sugiere el clásico signo de Romaña. También, presentaba lesión cutánea plana eritematosa entre el borde externo del recto abdominal izquierdo y la cicatriz umbilical, compatible con chagoma de inoculación. Además, se detectó hepatoesplenomegalia y fiebre de 38 y 39°C. A la auscultación se escuchó soplo mesosistólico paraesternal. El tratamiento con Clindamicina no fue resolutorio, por lo cual se procedió a investigar la presencia del agente causal en sangre, mediante exámenes directos e indirectos, serología y técnicas moleculares. El estudio parasitológico comprobó la presencia de *Trypanosoma cruzi*, que resultó de moderada virulencia en sangre, en modelos murinos, con amplio espectro de órganos invadidos especialmente células musculares de los tres tipos: esqueléticas cardíacas y lisas. El aislado fue compatible con los referentes moleculares del linaje TcI, el de más amplia distribución en Venezuela. Los resultados indican que hay transmisión activa de la enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, lo cual amerita más investigaciones.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Signo de Romaña, Linaje de *T. cruzi*, estado Anzoátegui, Venezuela.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), el cual

es transmitido por insectos hematófagos (Hemíptera, Reduviidae, Triatominae). Los tripomastigotes metacíclicos infectantes salen en las deyecciones del vector e ingresan al organismo, a través del orificio de la picadura, escoriaciones de la piel o atravesando la mucosa ocular, nasal u oral de mamíferos incluyendo al hombre. Habitualmente *T. cruzi* invade principalmente los tejidos musculares cardíaco y lisos, y nervioso, causando miocardiopatía chagásica, adenitis y disfunción de placa motora en vísceras profundas (Brener *et al.*, 2002).

En el presente trabajo se presenta un caso clínico de un preescolar con síndrome agudo compatible con enfermedad de Chagas, procedente del estado Anzoátegui, considerado como una entidad de media a baja endemicidad con una prevalencia de 9% (MPPS, 2007). Se describe el caso, se confirma la etiología por

- 1 Centro de Medicina Tropical de Oriente, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo Anzoátegui, Barcelona, estado Anzoátegui, Venezuela.
- 2 Escuela de Ciencias de la Salud, Universidad de Oriente (UDO) Núcleo Anzoátegui, Barcelona, estado Anzoátegui, Venezuela.
- 3 Hospital Universitario "Dr. Luis Razetti", Barcelona, edo. Anzoátegui, Venezuela.
- 4 Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela
- 5 Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED) Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, estado Aragua, Venezuela.
- 6 Instituto de Zoología Tropical (IZT), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela.

*Autor de correspondencia: elizabeth.ferrer@gmail.com

T. cruzi y se determina el comportamiento biológico y molecular del aislado parasitario. Se discuten las características e implicaciones del hallazgo.

Examen físico

Se realiza examen físico a preescolar masculino de 6 años, procedente del caserío Las Lajas, vía El Rincón, municipio Sotillo, estado Anzoátegui, con sintomatología de eritema y aumento de volumen bpalpebral (Fig 1). Inicialmente el paciente fue referido a un ambulatorio y tratado en primera fase con antibiótico oral sin mejoría, referido posteriormente al Hospital Universitario “Dr. Luís Razetti” de Barcelona, donde ingresó con el presunto diagnóstico de celulitis periorbitaria de ojo derecho y fue tratado con oxacilina sódica endovenosa. Al examen físico el niño presentó limitación de la apertura palpebral, edema con rubor y calor, de consistencia firme, no doloroso, que se extendía hasta el arco cigomático, sin afectación de conjuntiva bulbar, córnea y movimientos oculares. Se apreciaba secreción serosa. Al reconocimiento se observó también adenomegalia en ángulo mandibular derecho, soplo mesosistólico paraesternal medio izquierdo II/VI, lesión plana eritematosa a nivel del borde externo del recto abdominal izquierdo con cicatriz umbilical compatible con chagoma de inoculación. Otros signos y síntomas encontrados fueron; hígado debajo del borde costal derecho, no doloroso y bazo grado II/IV, con un incremento de edema y fiebre de 38 y 39 °C. Tratamiento con clindamicina no resolutorio y posterior ganglio satélite y esplenomegalia (grado III/IV).

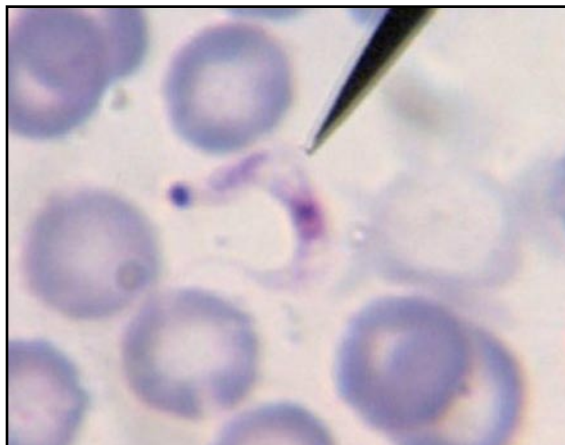
Fig. 1. Fotografía del Preescolar de 6 años del estado Anzoátegui, con signo de Romaña.



Diagnóstico

Métodos parasitológicos: Los métodos parasitológicos directos tales como; examen de sangre al fresco, extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa (Fig. 2) y técnica de Strout, así como los métodos parasitológicos indirectos, xenodiagnóstico artificial y hemocultivo, permitieron evidenciar las formas evolutivas características de *T. cruzi*.

Fig. 2. Forma tripomastigota sanguícola de *Trypanosoma cruzi* en fotografía de observación microscópica del extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa. Aumento 100 X.



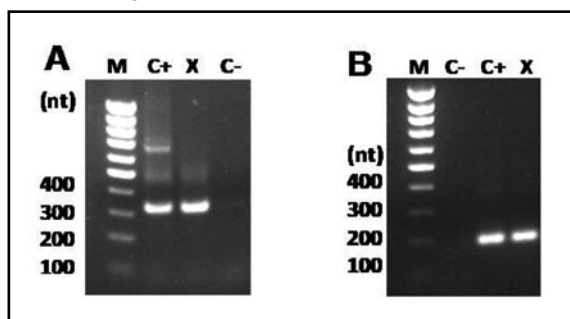
Métodos inmunológicos: Se realizó la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante las técnicas de hemaglutinación indirecta (Winner Laboratorios S.A.I.C) y ELISA (SmartTest) realizadas en el Centro de Medicina Tropical de la Escuela de Medicina de la Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui, resultando estas dos técnicas positivas. Se evidenció tanto IgM como IgG.

Métodos especializados y auxiliares: Se le realizó ecosonografía abdominal donde se evidenció hepatoesplenomegalia. La evaluación cardiológica mediante electrocardiograma y ecocardiograma, descartó afectación miocárdica aguda. La hematología completa del paciente mostró conteo de glóbulos blancos y recuento diferencial dentro de límites normales para su edad.

Métodos moleculares: Se realizaron técnicas de diagnóstico molecular del aislado parasitario mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en la Sección Parasitología Molecular del

Instituto de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua. Se realizó la detección de ADN satélite de *T. cruzi* según Moser *et al.*, (1989), empleando los cebadores específicos TCZ1 (cebador directo) 5' CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' y TCZ2 (cebador reverso) 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3', los cuales permitieron la amplificación de una región repetida de 188 pares de bases (pb) del ADN satélite de *T. cruzi* (Fig. 3). Además se realizó la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* según Wincker *et al.*, empleando los cebadores específicos: 121 (cebador directo) 5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3' y 122 (cebador reverso) 5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3', los cuales permitieron la amplificación de una banda de 330 pb característica del ADN de minicírculo (Fig. 3).

Fig. 3. PCR para diagnóstico. A) Amplificación de ADN de kinetoplasto de *Trypanosoma cruzi* por PCR, B) Amplificación de ADN satélite de *T. cruzi* por PCR. (M) marcador de tamaño del fragmento de ADN en nucleótidos (nt), (C+) Control positivo ADN extraído de *T. cruzi* Dm28c en cultivo, (X) ADN extraído de triatomino alimentado con sangre del paciente (C-) Control negativo, mezcla de PCR sin ADN.



Tratamiento

Se le administró al paciente benznidazol a una dosis de 5 a 7 mg por kg peso/día, dividido en dos dosis por día, por 90 días, la cual fue bien tolerada, no observándose ningún efecto adverso. La respuesta terapéutica al benznidazol se verificó al décimo día, al presentar el paciente mejoría del complejo oftalmoganglionar y al no encontrar formas parasitarias en varias visualizaciones de examen de sangre al fresco y a través del método de Strout. Se realizaron controles de hematología completa, plaquetas y química sanguínea.

Caracterización del aislado parasitario

La caracterización parasitológica del aislado se realizó mediante los parámetros de Barretto (1965) y de la OMS (1986). Para ello se extrajo 20 mL de sangre venosa periférica al paciente, los cuales fueron usados en la técnica de xenodiagnóstico artificial (Cedillos *et al.*, 1982), alimentando hasta la repleción 15 ninfas sanas de III y IV estadio de *Rhodnius prolixus* criados en el laboratorio, con examen regular de las heces a los 15 y 30 días post ingurgitación. Se realizó disección del intestino completo de los insectos mezclando el material fecal con solución salina al 0,85% para ser observado al microscopio óptico y para su cuantificación según el método de Brener modificado (Brener, 1962).

El material fecal fue inoculado intraperitonealmente a razón de 200 tripomastigotes metacíclicos/gr de peso del animal en lotes de 5 ratones hembras de la cepa NMRI isogénica (12 gramos de peso corporal promedio). Se determinó periodo pre-patente y nivel de parasitemia mediante el examen directo de la sangre de la vena de la cola. Muestras de necropsias de corazón, hígado, bazo, colon, duodeno, cerebro, pulmón, riñón, piel, músculo esquelético, ganglios linfáticos, diafragma, estómago, esternón, glándula suprarrenal, vejiga, lengua, páncreas y tejido adiposo, fueron tomadas de los animales con las más altas parasitemias (sacrificados según el Código de Bioética y Bioseguridad de FONACIT: www.fonacit.gob.ve).

El periodo pre-patente, en el modelo murino fue de 8 días post-inoculación con niveles máximos de parasitemia de $3,0 \times 10^5$ tripomastigotas/mL de sangre, revelando una virulencia media en sangre. Se observó un rango amplio de invasión tisular con 11 tejidos de 19 evaluados con pseudoquistes de amastigotas principalmente en células cardíacas, musculatura esquelética y lisa (Tabla I, Fig. 4 y 5).

La amplificación del espaciador no transcrito del gen de miniexón y de la fracción 3' del ADN ribosomal 24S α , mediante PCR según Souto *et al.* (1996) permitió identificar el aislado como TcI, evidenciándose la presencia de una banda de 350 pb y 110 pb, respectivamente (Fig. 6).

DISCUSIÓN

El examen físico del paciente y síntomas tales como fiebre, hepatomegalia y el signo de Romaña,

Tabla I. Hallazgos histotrópicos de los tejidos de ratones de la cepa NMRI, inoculados con el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido del paciente.

Órganos y tejidos	Presencia de pseudoquistes
Corazón	+++
Músculo esquelético	++
Estómago	++
Intestino delgado	++
Intestino grueso	+
Páncreas	+
Hígado	+
Esternón	+
Pulmón	+
Riñón	+
Lengua	+
Diafragma	-
Piel	-
Bazo	-
Glándula suprarrenal	-
Vejiga	-
Cerebro	-
Ganglio	-
Tejido adiposo	-

Grado de histotropismo	Nº de Pseudoquistes/50 campos de 400X
- = Parasitismo ausente	- = 0
+ = Parasitismo escaso	+ = 1 - 10
++ = Parasitismo moderado	++ = 10 - 30
+++ = Parasitismo abundante	+++ = 30 - 60
++++ = Parasitismo intenso	++++ = > 60

Fig. 4. Pseudoquiste en biopsia de tejido cardíaco de ratón de la cepa NMRI, inoculado con el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido del paciente, coloración Hematoxilina-Eosina, aumento 100X.

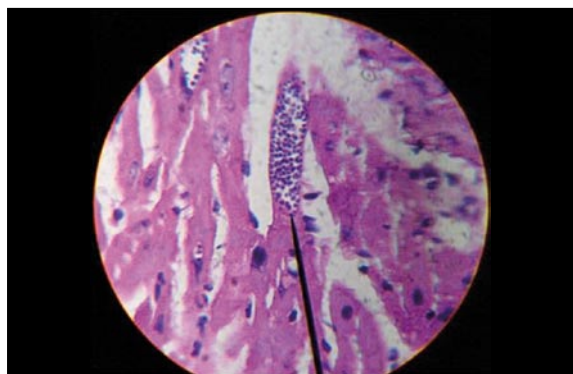


Fig. 5. Pseudoquiste en corte histológico de pelvis renal de ratón de la cepa NMRI, inoculado con el aislado de *Trypanosoma cruzi* obtenido del paciente, coloración Hematoxilina-eosina, aumento 100X.

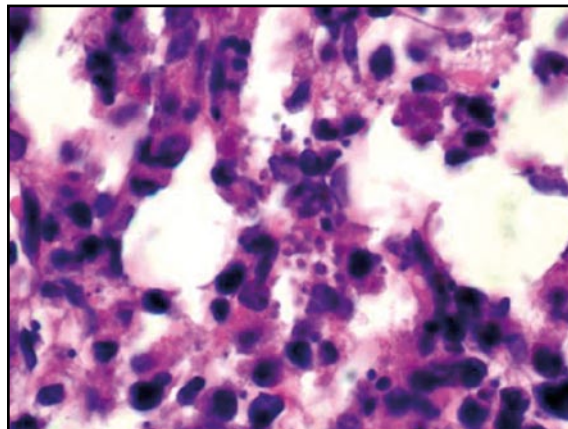
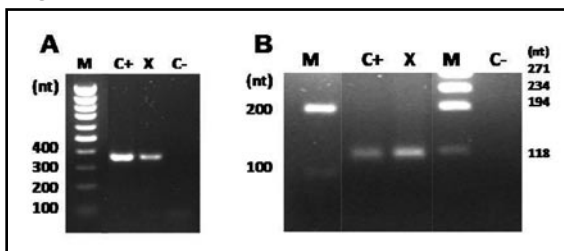


Fig. 6. PCR para caracterización de aislados de *Trypanosoma cruzi*. A) Amplificación de ADN de miniexón de *T. cruzi* por PCR, B) Amplificación de ADN ribosomal 24S a por PCR. (M) marcador de tamaño del fragmento de ADN en nucleótidos (nt), (C+) Control positivo, ADN extraído de *T. cruzi* Dm28c en cultivo, (X) ADN extraído de triatmino alimentado con sangre del paciente, (C-) Control negativo, mezcla de PCR sin ADN.



permitieron sospechar que se estaba frente a un caso agudo de enfermedad de Chagas.

El examen de sangre al fresco, extendido de sangre periférica coloreado con Giemsa y la técnica de Strout, evidenciaron la presencia de hemoflagelados con morfología típica para *T. cruzi*, en sangre. El Xenodiagnóstico artificial y hemocultivo de sangre obtenida del paciente con recuperación de metacíclicos infectivos en heces de los triatominos y el crecimiento de estadios polimorficos en medio de cultivo fueron confirmatorios del diagnóstico parasitario, demostrándose en este caso humano, una elevada parasitemia, donde los métodos parasitológicos resultaron adecuados para el diagnóstico.

Al menos dos de las pruebas inmunológicas recomendadas por el Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS, 2007), para confirmar casos de enfermedad de Chagas, hemaglutinación indirecta y el ensayo inmunoenzimático (ELISA), resultaron positivas. Además, por ELISA se evidenció tanto IgG como IgM, esta última característica de los procesos en fase aguda.

Las técnicas moleculares permitieron evidenciar la presencia de secuencias de ADN específico de *T. cruzi*, tales como ADN satélite y ADN de minicírculo de kinetoplasto, en triatominos alimentados con sangre del paciente, lo que permitió confirmar el diagnóstico parasitológico a través de pruebas moleculares.

Los parámetros parasitológicos de este aislado en modelo murino, con un período pre patente corto nivel medio de virulencia en sangre y un amplio espectro de invasión tisular, concuerdan con otros aislados de la región (de vectores, humanos y otros mamíferos) reveló que de no haber sido tratado el paciente podría este ser a la vez un portador sintomático en riesgo de muerte y un excelente reservorio actuante en la transmisibilidad (dada la considerable parasitemia) de un inminente foco de transmisión activa (Morocoima, 2002).

Es de hacer notar que en infecciones experimentales este aislado mostró un tropismo hacia cálice renal (Fig. 5), lo cual resulta novedoso ya que los registros de donde se involucra a *T. cruzi* y riñón se circunscriben a transmisiones a través de donación las cuales mantienen en dudas si es a través del órgano o de fluidos que lo acompañan en su inserción (Riarte *et al.*, 1999).

La presencia de TcI, confirma el hecho de que éste es uno de los linajes que se presentan en mayor frecuencia en áreas endémicas de Venezuela en humanos (Añez *et al.*, 2004) y en triatominos vectores (Felicangeli *et al.*, 2003; Carrasco *et al.*, 2005).

La casa del niño era de zinc con piso de tierra, se revisó todas las paredes de zinc, enseres, colchones, etc., no observándose infestación triatomínica en la vivienda. Alrededor de la vivienda había palmas de cocos, ecótopo natural por excelencia para triatominos en la región. Otras formas de transmisión, como por ejemplo transmisión oral por contaminación de alimentos y enseres, descrita en ambientes cerrados,

tal como el brote urbano en Chacao-Caracas (Alarcón de Noya, 2008), no debe descartarse. Se fumigó la casa y se les realizó serología a todos sus familiares resultando todos negativos. Sin embargo, desde el punto de vista epidemiológico, se hace necesario un examen exhaustivo por diferentes técnicas, de todos los miembros del núcleo familiar y del entorno e interior de la vivienda para determinar los factores de riesgo existentes.

Los resultados indican que a pesar de que las estadísticas institucionales colocan al estado Anzoátegui con un 9% de prevalencia (MPPS, 2007) en la infección Chagásica, la existencia de casos agudos y transmisión activa es un evento que requiere investigarse para tomar las adecuadas medidas de control.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer al Servicio de Pediatría e Inmunología del Hospital Luis Razetti y a la familia del niño objeto de este estudio, a quienes preservamos su identidad. Este trabajo fue financiado por los proyectos FONACIT G-2005-000406, CDCH-UCV PG 03-005609-2004 y Proyecto LOCTI-UC-Administradora 0220.

Chagas disease in Anzoátegui state, Venezuela: Detection of an acute case and parasitological and molecular characterization of the parasite isolate

SUMMARY

An acute case of Chagas disease in a preschool male, 6 years old, from the village of Las Lajas, municipality of Sotillo, state of Anzoátegui, Venezuela, is described. Clinically on the inspection and palpation, he presented right bipalpebral erythema and oedema with a subsequent satellite node, suggesting the classical Romana sign. He also had a flat erythematous lesion between the outer edge of the left rectus abdominis and the umbilical scar, compatible with a chagoma of inoculation. Hepatoesplenomegaly was also detected. The patient had fever of 38°C and 39°C. On auscultation, parasternal mesosistolic blow was heard. As treatment with Clindamycin was not resolving, we decided to investigate the presence of causal agent in blood, by means of direct and indirect methods, serology and molecular techniques. The parasitological study demonstrated the presence

of *Trypanosoma cruzi*, which showed moderate virulence in blood, murine models, with broad spectrum of colonized organs, especially cardiac, skeletal, smooth muscle cells and atypical invasion of kidneys. The molecular characterization of isolates showed a pattern compatible with TcI lineage, the most distributed in Venezuela. These results indicate that active transmission of Chagas disease in the state of Anzoátegui persists and more investigations are required.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Romanha sign, lineage of *T. cruzi*, Estado Anzoátegui, Venezuela.

REFERENCIAS

- Alarcón de Noya B. (2008). Enfermedad de Chagas en Caracas. *Salus*. **12(1)**: 4-5.
- Añez N., Crisante G., da Silva F. M., Rojas A., Carrasco H., Umezawa E.S., *et al.* (2004). Predominance of lineage I among *Trypanosoma cruzi* isolates from Venezuelan patients with different clinical profiles of acute Chagas' disease. *Trop. Med. Int. Health*. **9**: 1319-1326.
- Barretto M. P. (1965). Tripanosomas semelhantes ao *Trypanosoma cruzi* em animais silvestres e sua identificação com o agente etiológico da Doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **7**: 305-315.
- Brener Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. **4**: 389-396.
- Brener Z., Andrade Z. & Barral-Netto M. (2002). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2ª edição. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, Brasil.
- Carrasco H. J., Torrellas A., Garcia C., Segovia M. & Feliciangeli M. D. (2005). Risk of *Trypanosoma cruzi* I (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) transmission by *Panstrongylus geniculatus* (Hemiptera: Reduviidae) in Caracas (Metropolitan District) and neighboring States, Venezuela. *Int. J. Parasitol.* **35**: 1379-1384.
- Cedillos R. A., Torrealba J. W., Tonn, R. J., Mosca W. & Ortégón A. (1982). El xenodiagnóstico artificial en la Enfermedad de Chagas. *Bol. Of. San. Panamer.* **93**: 240-249.
- Feliciangeli M. D., Carrasco H., Patterson J. S., Suarez B., Martínez C. & Medina M.. (2004). Mixed domestic infestation by *Rhodnius prolixus* Stål, 1859 and *Panstrongylus geniculatus* Latreille, 1811, vector incrimination, and seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* among inhabitants in El Guamito, Lara State, Venezuela. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **71**: 501-505.
- MPPS (2007). *Guía para el Diagnóstico, Manejo y Tratamiento de Enfermedad de Chagas en fase Aguda a nivel de los Establecimientos de Salud*. Primera Edición.
- Morocoima A. (2002). *Caracterización parasitológica y molecular de aislados de Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi obtenidos del estado Anzoátegui*. Trabajo de grado de Maestría. Postgrado Nacional de Parasitología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- Moser D., Kirchhoff L. & Donelson J. (1989). Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 1477-1482.
- OMS (1986). *Report of a meeting on the feasibility of analytical epidemiological studies on Chagas disease: guidelines for a standard protocol*. Ginebra.
- Riarte A., Luna C., Sabatiello R., Sinagra A., Schiavelli R., De Rissio A., *et al.* (1999). Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience, 1989-1996. *Clin. Infect. Dis.* **29**: 561-567.
- Souto R. P., Fernandes O., Macedo A. M., Campbell D. A. & Zingales B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **83**: 141-152.
- Wincker P., Britto C., Pereira J.B., Cardoso M.A., Oelemann W. & Morel C.M. (1994). 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.* **51**: 771-777.

Recibido el 09/07/2007
Aceptado el 19/09/2008