

## Simposio

### ENFERMEDADES PARASITARIAS CONGÉNITAS

#### Malaria during pregnancy: a vaccine designed by nature

Patrick Duffy

Laboratory of Malaria Immunology and Vaccinology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases,  
National Institutes of Health, Rockville, MD, USA

Pregnant women have an increased susceptibility to malaria infection and disease, although the presentations of malaria vary according to the parasite species and the immune status of the mother. Pregnancy malaria due to *Plasmodium falciparum* is frequently severe in non-immune women. In areas of stable transmission, where women are semi-immune and often asymptomatic during infection, falciparum malaria is an insidious disease that can often causes death in mother or offspring without recognition that the inciting agent was a malaria parasite. Severe anemia and hypertension in the mother, and low birth weight and infant mortality in the offspring, are common sequelae that can arise, even though the mother is not aware of her infection.

Pregnancy malaria caused by *P. falciparum* is characterized by infected erythrocytes that bind

to chondroitin sulfate A and sequester in the placenta. These parasites have a unique adhesion phenotype and distinct antigenicity, suggesting unique surface proteins that might be targeted for vaccine development.

Women become resistant to pregnancy malaria as they acquire antibodies against placental infected erythrocytes, leading to higher hemoglobin levels and heavier babies. Exported proteins of placental infected erythrocytes have been identified, including both variant and conserved antigens, and some of these are in preclinical development as vaccines. A vaccine that prevents *Plasmodium falciparum* malaria in pregnant mothers is feasible, and would save potentially hundreds of thousands of lives each year.



#### Avances en epidemiología y patogénesis de la toxoplasmosis congénita

Jorge Enrique Gómez

Grupo de Estudio en Parasitología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

Los resultados de los estudios cooperativos y multicéntricos en toxoplasmosis congénita en los últimos años han aportado nuevos conocimientos y conceptos que han transformado de manera significativa nuestra comprensión del problema y con grandes implicaciones para los programas de control.

El primer avance es la comprobación de la existencia de diferencias en el desenlace clínico de los niños con toxoplasmosis congénita de Suramérica con respecto a los niños europeos y de Norteamérica. Esto fue primero reportado durante el estudio colaborativo "Systematic Review on Congenital Toxoplasmosis" (SYROCOT) (1) en el cual se encontró que el riesgo de lesiones

oculares era mucho mayor en las cohortes de niños infectados de Suramérica (47 %; 18/38) que en las cohortes europeas (14 %, 79/550).

Otro hallazgo fue que el riesgo de transmisión disminuía significativamente a mayor latitud, OR=0,71 para cada 5° de latitud mayor del sitio geográfico de la cohorte.

Estos hallazgos luego fueron confirmados en un estudio prospectivo durante cuatro años de cohortes en Europa y Brasil, en el que se encontró que los niños brasileños tenían lesiones oculares más grandes y numerosas, que sus contrapartes en Europa (2). Esto probablemente puede explicarse por la diferencia entre las cepas en Suramérica y las de Europa o Norteamérica (3).

El segundo hito se refiere a la identificación de los genes de susceptibilidad para toxoplasmosis congénita. En un estudio cooperativo con cohortes norteamericanas y europeas se identificaron polimorfismos en el gen que codifica para una proteína transportadora de ATP, la ABCA4, subfamilia A, y mayor probabilidad de enfermedad ocular y cerebral y polimorfismos en el gen *COL2A1* que codifica para colágeno de tipo II (predominante en el tejido ocular) y mayor probabilidad de compromiso ocular en niños con infección congénita por *Toxoplasma* sp. (4).

Finalmente, el primer estudio multicéntrico colombiano en toxoplasmosis congénita (5) aportó experiencia para implementar los programas de control y nuevos conocimientos epidemiológicos. Este estudio se hizo en 19 hospitales y centros de atención materno-infantil de siete ciudades. Entre marzo de 2009 y mayo de 2010, se recolectaron 15.333 muestras de sangre de cordón umbilical y se aplicaron varios métodos para determinar marcadores de riesgo para esta infección. Se encontraron 15 niños con infección congénita, ocho eran asintomáticos y se les inició tratamiento. De los ocho niños sin síntomas, tres tuvieron tratamiento en el embarazo.

Por el contrario, ocho niños tenían síntomas diversos, ninguno de ellos fue diagnosticado durante el embarazo, ninguno recibió tratamiento antes del nacimiento y tres de ellos fallecieron como consecuencia de complicaciones de la infección. Los pediatras no sospechaban la toxoplasmosis como causa de los síntomas en estos niños y si no se hubiera hecho el programa de tamización, no se hubieran detectado.

Este estudio permitió demostrar que existen ciudades en Colombia con mayor frecuencia de marcadores de riesgo para la infección congénita que otras (5). Florencia (Caquetá) y Armenia (Quindío) tuvieron los porcentajes más altos (3 y 6 por cada 100 nacidos vivos, respectivamente). Bogotá, Barranquilla y Bucaramanga tuvieron porcentajes intermedios (1, 2 y 1 por 100 nacidos vivos, respectivamente). Cúcuta y Riohacha tuvieron los porcentajes más bajos (5 y 7 por 1.000 nacidos vivos, respectivamente).

Por primera vez en un estudio epidemiológico sobre toxoplasmosis congénita, se logró descubrir una relación entre alta o baja frecuencia de marcadores de riesgo para toxoplasmosis congénita y alta o baja precipitación de lluvias por ciudad, lo cual aporta un nuevo conocimiento sobre los factores que aumentan la frecuencia de esta infección (5).

En conclusión, estos estudios aportan los siguientes elementos que deben ser tenidos en cuenta hacia el futuro para lograr reducir la morbilidad y mortalidad de esta infección:

1. Es necesario incluir la determinación de los factores genéticos del niño y de la tipificación del genotipo del parásito para evaluar las intervenciones.
2. La frecuencia y alto impacto de la infección en Suramérica hacen prioritarias la implementación y la evaluación de los programas de control y la convierten en sitio privilegiado para la realización de ensayos clínicos para candidatos de vacunas.
3. La situación epidemiológica no es homogénea para las diferentes regiones geográficas, y aparece como determinante la tasa de pluviosidad para explicar estas diferencias.

#### Referencias

1. SYROCOT. Effectiveness of prenatal treatment for congenital toxoplasmosis: a metanalysis of individual patient's data. *Lancet*. 2007;369:115-22.
2. Gilbert RE, Freeman K, Lago EG, Bahia-Oliveira LM, Tan HK, Wallon M, *et al*. Ocular sequelae of congenital toxoplasmosis in Brazil compared with Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2008;2:e277.
3. Gómez-Marín JE. *Toxoplasma* strain nomenclature. *J Infect Dis*. 2009;200:1012.
4. Jamieson SE, de Roubaix LA, Cortina-Borja M, *et al*. Genetic and epigenetic factors at *COL2A1* and *ABCA4* influence clinical outcome in congenital toxoplasmosis. *PLoS ONE*. 2008;3:e2285.
5. Gómez-Marín JE, de la Torre A, Angel-Muller E, Rubio J, Arenas J, Osorio E, *et al*. First Colombian multicentric newborn screening for congenital toxoplasmosis. *PLoS Neglected Trop Dis*. 2011; en prensa.



## **Leishmaniasis congénita: ¿la ausencia de evidencia es evidencia de ausencia?**

Bruno Travi

Department of Internal Medicine-Infectious Diseases, University of Texas Medical Branch,  
Galveston, TX, USA

Las enfermedades infecciosas, sobre todo aquellas que son endémicas, se caracterizan por tener una alta proporción de individuos con manifestaciones subclínicas. En el caso de las leishmaniasis se estima que sólo el 10 % de la población infectada desarrolla la enfermedad. Por lo tanto, es factible que las mujeres embarazadas sin signos clínicos de leishmaniasis estén exponiendo a los fetos al contacto con el parásito.

Existen registros esporádicos de transmisión congénita de *Leishmania donovani*, o *L. infantum*, de madres sintomáticas pero más importante aún, de madres asintomáticas. Debido a que nunca se ha realizado una investigación enfocada a las infecciones congénitas, se desconoce la contribución de este mecanismo de transmisión a la epidemiología de las leishmaniasis.

Por este motivo, el objetivo de nuestro estudio, realizado en el modelo hámster infectado con *Leishmania panamensis* o *L. donovani*, fue determinar la importancia de la infección en las hembras gestantes, la frecuencia de transmisión

congénita y el impacto sobre la salud de las crías. La eficiencia reproductora de las hembras infectadas con *L. donovani* se vio seriamente disminuida pero no sufrió alteraciones en el caso de *L. panamensis*.

En el análisis por PCR se encontró que la infección congénita ocurría en el 25,8 % y el 14,6 % de las crías nacidas de madres infectadas con *L. panamensis* o *L. donovani*, respectivamente. En las dos especies de *Leishmania* hubo mayor mortalidad de crías durante la lactancia y al destete comparadas con los controles. Las crías nacidas de hembras infectadas con *L. donovani* tuvieron menor ganancia de peso ( $p < 0,001$ ) y hematocritos más bajos que los controles ( $p = 0,0045$ ). Además, las crías nacidas de madres infectadas con *L. donovani* eran más susceptibles al reto homólogo.

Por lo tanto, la infección congénita con leishmanias que producen enfermedad visceral podría ocasionar mortalidad intrauterina y perinatal e incrementar la susceptibilidad a *Leishmania* spp. en individuos de las regiones endémicas.



## **Vigilancia de la enfermedad de Chagas congénita en Colombia**

Zulma Cucunubá<sup>1</sup>, Astrid Carolina Flórez<sup>1</sup>, Marleny Montilla<sup>1</sup>, Paula Pavía<sup>2</sup>,  
Rubén Santiago Nicholls<sup>1</sup>, Concepción Puerta<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Parasitología, Instituto Nacional de Salud, Bogotá D.C., Colombia

<sup>2</sup> Laboratorio de Parasitología Molecular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, D.C., Colombia

### **Introducción**

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas ha adquirido mayor importancia en los últimos años en la medida en que la transmisión vectorial y por transfusiones, han sido controladas (1). Según estimaciones recientes, en Colombia se calcula que al año ocurren 1.000 nuevos casos de Chagas congénito (2). A pesar de esto, en Colombia actualmente no existe un programa de tamización para la enfermedad de Chagas en mujeres gestantes y, por lo tanto, estos casos no son identificados ni informados al sistema de vigilancia en salud pública.

Por esta razón, actualmente se desarrolla el proyecto titulado "Desarrollo e implementación de un programa piloto de vigilancia de Chagas congénito

en Colombia", con el cual se busca conocer la frecuencia de enfermedad de Chagas en mujeres gestantes en diferentes zonas endémicas, la tasa de transmisión congénita, los factores de riesgo asociados, los procedimientos diagnósticos más útiles, la eficacia del tratamiento etiológico en recién nacidos y, finalmente, hacer un análisis de costo-efectividad del programa, en cinco departamentos endémicos como son Arauca, Boyacá, Casanare, Meta y Santander. En este artículo se presentan los resultados preliminares.

### **Metodología**

Se trata de un estudio de corte transversal de instituciones hospitalarias de cinco departamentos considerados con algún grado de endemia. El tamaño de la muestra se estimó según la proyección

de embarazos para 2010 en los departamentos de interés, para un total de 4.844 mujeres gestantes.

La selección de las instituciones hospitalarias se hizo mediante criterios de disponibilidad del servicio de control prenatal, inclusión de mujeres gestantes de diferentes regímenes de atención y viabilidad de seguimiento durante el parto y posterior al mismo.

Se desarrolló una guía de procedimientos (3) la cual fue difundida ampliamente mediante un proceso de capacitación en todas las instituciones. Se desarrolló y validó una encuesta de factores de riesgo, y se aplicó previo entrenamiento. La tabulación fue llevada a cabo por personal experto y se hizo control de calidad mediante doble digitación.

Las mujeres gestantes fueron incluidas durante el proceso de control prenatal. Luego de obtener el consentimiento informado, se tomó una muestra de suero para la detección de anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma* mediante técnicas de ELISA, inmunofluorescencia indirecta y hemaglutinación indirecta. Los casos confirmados por dos pruebas serológicas por diferente metodología fueron informados y encaminados al proceso de atención y seguimiento. A los bebés se les practicó hemocultivo y pruebas moleculares para la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi*, durante el nacimiento o en el primer mes de vida, con seguimientos, en promedio, cada tres meses hasta completar el primer año de vida.

La información fue compartida y discutida con las secretarías de salud departamentales para la realización de visitas domiciliarias, verificando la existencia o ausencia de vectores intradomiciliarios y garantizando las actividades de control de transmisión vectorial.

El protocolo de este estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Salud, mediante acta número 002 de 2008.

### Resultados preliminares

Hasta la fecha se han incluido 3.784 mujeres gestantes en los cinco departamentos, y se ha encontrado una frecuencia general de muestras positivas para infección por *T. cruzi* de 2,67 %. La frecuencia en las mujeres gestantes incluidas en los diferentes departamentos se presenta en la tabla 1.

A la fecha se ha culminado la tamización en los departamentos de Boyacá, Casanare y Meta, pero aún continúa la inclusión de mujeres gestantes en los departamentos de Arauca y Santander.

En un análisis preliminar de la información para el departamento de Casanare, se encontró que los factores más significativamente asociados a la frecuencia de infección por *T. cruzi*, fueron los siguientes: edad mayor de 29 años [OR=3,5 (IC<sub>95%</sub>: 1,4-17,0)]; contacto con el vector en el último año [OR=4,4 (IC<sub>95%</sub>: 2,0-8,5)]; antecedentes de enfermedad de Chagas en familiares [OR=2,2 (IC<sub>95%</sub>: 1,0-4,9)]; residencia rural actual [OR=3,0 (IC<sub>95%</sub>: 1,5-6,0)], y condiciones de vivienda en la infancia [OR=3,6 (IC<sub>95%</sub>: 1,7-7,6)].

De 101 casos positivos, se ha realizado visita domiciliaria a 82 (81,2 %), y se han encontrado 12 casos positivos en familiares de diferentes edades. Como desenlace del embarazo, hasta la fecha sólo se ha conocido un caso de aborto espontáneo entre las mujeres gestantes positivas, el cual ocurrió a la semana 20 de gestación. De las 100 mujeres gestantes con transcurso regular del embarazo, hasta la fecha han nacido 67 niños, y se ha logrado la evaluación y el seguimiento de 55 (82 %) y en ninguno de los casos se reportó alguna alteración física relacionada con Chagas congénito al momento del nacimiento.

Sólo dos casos fueron hospitalizados en su primer mes de vida, uno de ellos por neumonía y otro por diagnóstico de sífilis congénita. Ninguno

**Tabla 1.** Frecuencia de infección por *Trypanosoma cruzi* en mujeres gestantes de cinco departamentos de Colombia (resultados preliminares).

Departamento	Mujeres gestantes incluidas	Casos confirmados	Frecuencia de infección por <i>Trypanosoma cruzi</i> (%)	IC 95%
Arauca	383	8	2,09	0,97 - 3,92
Boyacá	438	14	3,19	1,83 - 5,18
Casanare	982	39	3,97	2,87 - 5,33
Meta	863	2	0,23	0,03 - 0,76
Santander	1.118	38	3,40	2,45 - 4,58
Total	3.784	101	2,67	2,19 - 3,22

de los niños ha sido positivo en las pruebas de hemocultivo. Las pruebas serológicas antes de los 6 meses de vida han sido positivas en el 20 % de los casos (11/55). Solamente 6 niños han cumplido más de 1 año de vida, y en ninguno de estos casos se ha identificado persistencia de anticuerpos.

La mayoría de las mujeres gestantes se encuentran en proceso de evaluación médica y cardiológica, previo al inicio de tratamiento etiológico, el cual será suministrado una vez terminen el periodo de lactancia.

### Discusión

De acuerdo con los resultados preliminares, este proyecto muestra una frecuencia importante de infección por *T. cruzi* en mujeres gestantes de diferentes zonas endémicas (2,67 %) y, hasta la fecha, no ha habido ningún caso positivo en niños hijos de mujeres positivas, siendo la magnitud del evento inferior a la encontrada previamente en países del Cono Sur como Argentina y Bolivia (1,4), pero superior a la encontrada por otros autores en Perú y Brasil (5,6). Hasta la fecha, los resultados en mujeres gestantes, aunque no en recién nacidos, son comparables con un estudio previo en dos municipios endémicos de Colombia en el cual se encontró una prevalencia de 3,97 % en mujeres gestantes y una tasa infección transplacentaria de 20 % en los hijos de las madres infectadas (7,8).

Puesto que el rango de participación de mujeres gestantes está entre los 13 y los 42 años, estos resultados igualmente pueden ser un reflejo de la prevalencia de la enfermedad de Chagas en población joven de estos departamentos. Pese a que hasta la fecha no se han encontrado casos positivos por pruebas parasitológicas en recién nacidos, ni con persistencia de pruebas serológicas posterior al noveno mes de vida, es necesario finalizar todo el seguimiento dado que la gran mayoría no ha completado el seguimiento, una gran parte de los bebés no ha nacido y un pequeño porcentaje no ha tenido evaluación.

Algunas de las principales limitaciones presentadas hasta el momento se relacionan con el seguimiento, especialmente de las mujeres gestantes que viven en las zonas más apartadas, dadas las dificultades de comunicación y transporte y el acceso limitado que tienen a los servicios de salud.

Este proyecto igualmente evidencia la necesidad de generar toda una infraestructura a nivel nacional para la implementación de este tipo de

programas, y la importancia de la participación de todos los grupos relacionados con la gestación, maternidad segura, primera infancia, grupos de enfermedades transmitidas por vectores, vigilancia en salud pública, calidad de atención, las entidades hospitalarias desde primer nivel hasta los niveles superiores de atención y, además, la interacción constante con la mujer gestante y su grupo familiar para lograr el seguimiento adecuado.

### Agradecimientos

A cada una de las personas participantes en las diferentes instituciones hospitalarias y a las Secretarías de Salud Departamentales de Arauca, Boyacá, Casanare, Meta y Santander. A Colciencias que financia este proyecto mediante el contrato 644-08.

### Bibliografía

1. Sosa-Estani S. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38(Suppl.2):29-32.
2. Pan American Health Organization. Quantitative estimation of Chagas disease in the Americas. OPS/HDM/CD/425-06:6. Washington, D.C.: PAHO; 2006.
3. Cucunubá ZM, Flórez AC, Montilla M, Pavía P, Nicholls RS, Puerta CJ. Guía de procedimientos. Programa piloto de vigilancia de Chagas congénito en Colombia. En: [http://puj-portal.javeriana.edu.co/portal/page/portal/Facultad%20de%20Ciencias/zgi\\_enf\\_infecciosas/1\\_pdf/Archivo%2017b.%20Guia%20de%20procedimientos.pdf](http://puj-portal.javeriana.edu.co/portal/page/portal/Facultad%20de%20Ciencias/zgi_enf_infecciosas/1_pdf/Archivo%2017b.%20Guia%20de%20procedimientos.pdf).
4. Torrico F, Alonso-Vega C, Suárez E, Rodríguez P, Torrico MC, Dramaix M, *et al.* Endemic level of congenital *Trypanosoma cruzi* infection in the areas of maternal residence and the development of congenital Chagas disease in Bolivia. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38:17-20.
5. Mendoza Ticona CA, Córdova Benzaquen E, Ancca Juárez J, Saldaña Díaz J, Torres Choque A, Velásquez Talavera R, *et al.* The prevalence of Chagas' disease in puerperal women and congenital transmission in an endemic area of Peru. *Rev Panam Salud Pública.* 2005;17:147-53.
6. Araujo A, Castagno V, Gallina T, Berne M. Prevalência da doença de Chagas em gestantes da região sul do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42:732-3.
7. Manrique FG, Ospina JM, Herrera GM, Nicholls RS, Montilla M, Flórez AC, *et al.* Enfermedad de Chagas transplacentaria en Miraflores y Moniquirá, Boyacá. *Biomédica.* 2007;27:172.
8. Pavía PX, Montilla M, Flórez C, Herrera G, Ospina JM, Manrique F, *et al.* The first case of congenital Chagas' disease analyzed by AP-PCR in Colombia. *Biomédica.* 2009;29:513-22.



## Molecular studies of *Trypanosoma cruzi* natural populations involved in transplacental transmission

M. M. C. Bisio, J. M. Burgos, A. G. Schijman

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas Dr. Mariano Levin, Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular, CONICET, Buenos Aires, Argentina

### Introduction

Chagas disease ranks among the world's most neglected tropical diseases and congenital transmission is increasingly responsible for Chagas disease urbanization in non-endemic areas. Recent estimates indicate 7,694,500 infected people, and 41,200 and 14,385 new cases per year due to vectorial and congenital transmission, respectively (WHO, 2007). Little is known about *Trypanosoma cruzi* infection during pregnancy and the factors involved in vertical transmission. Indeed, enhanced parasitemia, *T. cruzi* genetic diversity and fetal and maternal immunity have been proposed to play a role (Carlier, 2010).

Congenital transmission of *T. cruzi* may occur in some or all the gestations from a *T. cruzi*-infected mother. Variable rates of congenital transmission have been reported in different geographical areas, where different parasitic strains predominate, suggesting that parasitic genotypes might play a role in the risk of congenital transmission. Moreover, in cases of transmission it is unknown if the whole maternal *T. cruzi* population or certain clones are preferentially transmitted by the transplacental route.

### Objective

Molecular assays for amplification and profiling of parasite minicircle DNA and identification of discrete typing units (DTU) using improved PCR strategies targeted to nuclear genomic markers were conducted in bloodstream and placental samples from chronic Chagas disease women and congenitally infected children.

### Patients and methods

The study was approved by the Ethical Committees of the participating institutions with written informed consent. *Pregnant women:* 104 pregnant women seropositive for *T. cruzi* infection (mean age, 29.5 years; range: 18-45 years) attended at the Service of Obstetrics of Hospital Rivadavia in Buenos Aires during 107 gestational periods. All of them were at the indeterminate phase of Chagas disease and acquired *T. cruzi* in endemic regions of Argentina, Bolivia and Paraguay, residing in Buenos Aires, not endemic for Chagas disease. Pregnant women were followed-up during pregnancy. Two to five

samples were sequentially collected on a monthly basis. Forty-four placental specimens conserved in ethanol were also collected at time of delivery.

*Congenitally infected children:* 47 children with congenital Chagas infection (mean age, 2.3 years; range: 1 day to 12 years) and seven mothers (mean age, 29.8 years; range 18-40 years) were studied. All congenital Chagas infection children were born in Buenos Aires. Two ml of peripheral blood from paediatric children and 10 ml from women were collected and mixed with guanidine-EDTA buffer.

*Molecular assays:* Total DNA was purified from 50 mg of placental tissue, 500 µl of peripheral blood from adults or 100 µl of peripheral blood from paediatric patients by solvent extraction. Detection of *T. cruzi* infection was carried out by PCR targeted to kDNA according to standardized protocols (Schijman, *et al.*, 2011).

Specimens with positive results were analyzed to identify *T. cruzi* DTUs by PCR-based procedures to the intergenic region of spliced-leader genes (SL-IR, SL-IR I and SL-IR II) and the D7 domain of the 24Sα ribosomal RNA genes (24Sα rDNA PCR) (Burgos, *et al.*, 2007).

Minicircle signatures from *T. cruzi* populations were analyzed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of kDNA amplicons obtained from bloodstream and placental specimens of pregnant women and congenitally infected children (Burgos, *et al.*, 2007).

### Results

In pregnant women, the sensitivity of kDNA-PCR increased from 75.6% to 95.6% when one to three blood samples were analyzed sequentially. Different profiles of PCR positivity were observed, finding 6% of women with undetectable parasitic loads (N-PCR), 47% of women with persistently PCR positive samples (P-PCR), and 47% with alternate PCR positive and negative samples (F-PCR). Congenital Chagas infection was diagnosed in 3 neonates born to kDNA-PCR positive mothers, one transmitting congenital Chagas infection in a previous gestation, pointing to family clustering of congenital transmission. Fourteen of 44 placental samples were kDNA-PCR positive, all from non-congenital Chagas infection transmitting women.

Placental PCR positivity was not related to maternal bloodstream PCR positivity and placental parasitic subpopulations not observed in bloodstream were detected by minicircle signatures (figure 1). PCR targeted to intergenic regions of spliced-leader genes showed predominance of DTU group TcII/V/VI and only one patient infected with Tc I.

*Trypanosoma cruzi* V was the prevalent genotype among 36/38 PCR-positive congenitally infected infants and 5/5 mothers who transmitted congenital Chagas disease coming from endemic localities of Argentina and Bolivia. Furthermore, minicircle signatures from maternal and infants' bloodstream in seven cases of mothers and congenitally infected children were nearly identical between each mother and her infant and unique to each mother-infant case, a feature that was also observed in twin deliveries.

### Conclusion

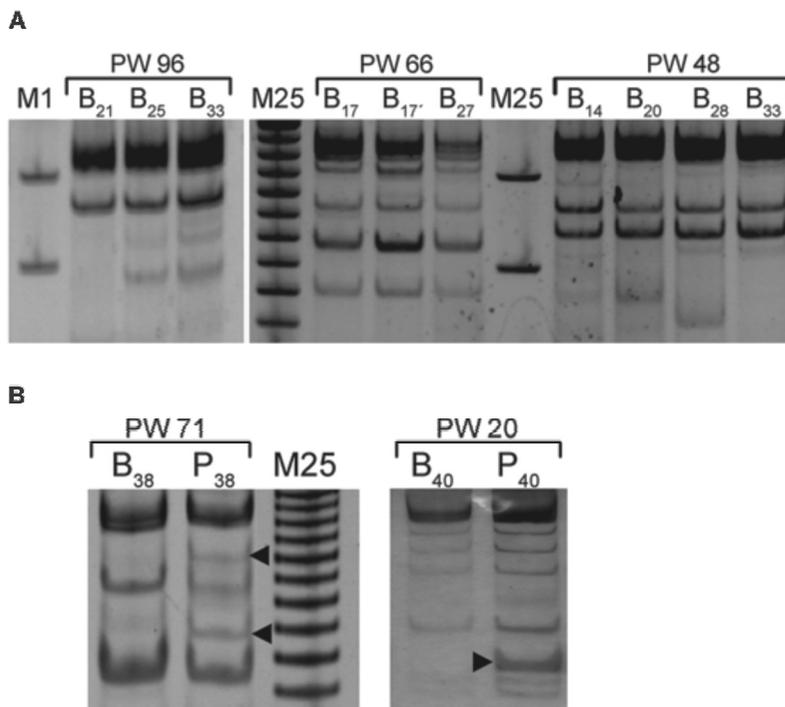
Sequential kDNA-PCR assays in blood provided high sensitivity for detection of *T. cruzi* DNA in chronic Chagas disease pregnant women. Different profiles of PCR positivity were observed but variability of PCR profiles did not seem to be associated with the identity of *T. cruzi* DTU, given that among both N-PCR and P-PCR women, Tc II/V/VI was the predominant DTU group. Indeed, the higher prevalence of this DTU group is in agreement with studies involving culture isolates

or patients' samples at the southern cone of America. The exception was a woman infected by Tc I; interestingly she was born in Chaco where other chronic cases infected with Tc I have been reported. Future quantitative PCR assays will allow to demonstrate if among PCR positive mothers, parasitic loads increase during pregnancy.

No association was found between PCR positivity in placental tissues and bloodstream from the same patients. Patients with negative bloodstream but positive placental PCR findings suggest the existence of strains with placental tropism. Our results also demonstrate that PCR analysis in a placental sample is not useful for the diagnosis of congenital infection, given that all PCR positive placental samples belonged to non Chagas infection transmitting mothers.

Bloodstream parasitic populations showed stable minicircle profiles during pregnancy, specific for each patient. But in paired PCR positive blood and placental samples, the differences observed between parasite minicircle signatures found in placenta and blood might reflect co-infection of women with different parasite genotypes.

Altogether, the data reported in this study do not support a direct association between the *T. cruzi* DTUs or minicircle signatures with the occurrence of congenital Chagas infection. In cases of transmission, we observed high degree of intra-



**Figure 1.** *MspI* and *RsaI* digestion patterns of kDNA-PCR products amplified from blood (B) or placental (P) specimens from pregnant women. Subscript number corresponds to gestational weeks.

A) Digestion profiles from serial samples during pregnancy; B) comparison of blood and placental profiles; placental minicircle fragments not present in bloodstream are indicated by black arrows.

PW, pregnant women; M1, 1 Kb plus DNA ladder; M25, 25bp DNA ladder (Invitrogen™).

family minicircle homogeneity detected between bloodstream populations of mothers and congenital Chagas infection siblings, as well as between congenital Chagas infection twins.

*Funding:* This project received major support by WHO-TDR ID 20285, Bunge & Born Foundation, CONICET (PIP 112-2008-01-02915), PICT 33955 from the National Agency of Science and Technology to AGS

### References

1. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, *et al.* Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital
2. Carlier Y, Truyens C. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*, one hundred years of research. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American Trypanosomiasis Chagas Disease. USA: Elsevier; 2010. p. 539-81.
3. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, *et al.* International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011;5:e931.
4. WHO. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/06. Geneva: World Health Organization; 2007.

