

Hallazgo de *Trypanosoma cruzi* en momias de más de 4000 años de antigüedad

Doctores Carlos Jaramillo,
Felipe Guhl,
María Fernanda Gomez,
Rossana Yockteng,
Gustavo Vallejo.

Resumen

En este trabajo se reporta una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que permite la detección de *Trypanosoma cruzi* por medio del estudio directo de tejidos momificados humanos. Las muestras fueron tratadas para la extracción de ADN y luego sometidas a la prueba de PCR, basándose en la amplificación de la región variable de los minicírculos del ADN del cinetoplasto (kADN) de *T. cruzi*. Debido a la especificidad de los iniciadores y a la alta reproducibilidad de la prueba se pudo estudiar la presencia de kADN en tejidos de corazón, esófago e intestinos así como la concordancia de los patrones obtenidos con ADN de parásitos de cultivo de cepas Colombianas. De un total de 40 muestras de 26 momias, ADN extraído de 17 fragmentos de tejido (pertenecientes a 13 individuos) fue positivo para kADN específico de *T. cruzi*, mientras que para los controles negativos no se obtuvo el producto esperado de 330bp.

Introducción

La práctica de la momificación de cuerpos humanos en el nuevo mundo fue una característica muy común en la mayoría de las sociedades prehistóricas pertenecientes a diferentes grupos aborígenes que habitaron lo que hoy corresponde a países como Chile, Colombia, Argentina, Ecuador, Perú, Bolivia, algunas regiones de Mesoamérica y el sur de Estados Unidos.

El estudio de restos humanos antiguos, no sólo permite conocer cómo murieron nuestros antepasados, sino también aporta información sobre las enfermedades que sufrieron y que en muchos casos siguen afectándonos, ayudando a desarrollar terapias para

combatirlas. Dentro de la biología humana, la paleopatología estudia las enfermedades que padeció el hombre en el pasado, algunas de las cuales tuvieron carácter de endemia (presencia permanente en una zona). Muchas de estas dolencias como es el caso de la enfermedad de Chagas, la fiebre amarilla y el cólera, que al parecer causaron estragos en el pasado, merecen especial atención porque aún siguen siendo un problema importante de salud pública.

La incidencia de la enfermedad de Chagas es de cerca de 1 millón de casos por año y la mortalidad estimada arroja valores de unas 5.000 muertes por año.

Esta enfermedad se caracteriza por tener una fase inicial de infección, durante la cual hay pará-

* Los profesores Carlos Jaramillo y Felipe Guhl pertenecen al CIMPAT. El profesor Gustavo Vallejo y los demás colaboradores investigan en el Laboratorio de Parasitología Tropical, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima, Ibagué.

sitos circulando a través del flujo sanguíneo, además de replicación del parásito en células del miocardio, macrófagos, fibroblastos y células del sistema nervioso. Después de 8 a 10 semanas sigue la fase indeterminada en la cual disminuye la parasitemia debido a la respuesta inmune. Este período puede tener una duración de 10 a 20 años y generalmente es asintomático. Por último en la fase crónica hay baja parasitemia y lesiones que incluyen cardiopatía crónica y alteraciones crónicas digestivas y neurológicas (2).

Distintos rasgos paleopatológicos como son megacolon, megaesófago y cardiopatías, encontrados por Rothhammer et al, 1985, en momias chilenas datadas de 470 B.C. hasta 600 A.D., fueron motivación suficiente para emprender el estudio de detección de ADN de *T. cruzi* en cuerpos con momificación espontánea. Hemos recuperado ADN de varios entierros de la cultura Chinchorro entre otras, lo que ha permitido el análisis basado en PCR de secuencias de ADN mitocondrial. El material genético fue obtenido a partir de tejido suave interno de 26 individuos. Este ensayo podrá ser aplicado en la detección de otros agentes infecciosos en tejidos momificados.

Enfermedad de Chagas en Sudamérica precolombina

Los estudios sobre condiciones osteopatológicas en momias han tenido un considerable desarrollo en la Antropología Física (3). Sin embargo, en los últimos tiempos, análisis en tejidos blandos han permitido conocer de alguna forma el estado de salud de las poblaciones precolombinas, diagnosticar causas de muerte con cierto grado de exactitud y describir patologías de enfermedades que han sido siempre un problema importante en la salud del hombre como es el caso de la enfermedad de Chagas, todo esto gracias a que nuevas técnicas de investigación y diagnóstico como la biología molecular han sido desarrolladas para que sean aplicables a materiales arqueológicos.

Los diferentes estudios en restos humanos han generado un gran potencial informativo que junto con datos históricos, complementan la información necesaria para la interpretación de nuestro pasado. De esta forma se pueden establecer vínculos más consistentes entre los datos fisiopatológicos y la naturaleza socio-cultural del grupo observado para una reconstrucción más acertada del poblamiento prehispanico (3).

La región de origen de las momias en estudio es el valle de Azapa, asiento de una extensa unidad

poblacional con características regionales, a la que se le ha llamado cultura Chinchorro. Los Chinchorros fueron unos cazadores pescadores, que se establecieron en las regiones costeras del sur del Perú y norte de Chile, hace aproximadamente 9.000 años.

La movilidad de un lugar a otro jugó quizás un papel importante, debido a la economía de subsistencia. Esto sugiere la hipótesis de oleadas migracionales provenientes de los trópicos que, vía trasandina, llegaron hasta las zonas más áridas.

Climatológicamente esta zona es un lugar muy seco y árido, frecuentemente erosionado por el viento. Las condiciones de escasa humedad hicieron que el sector fuera considerado ideal para habitar, al estar lejos de charcos y ciénagas, habitadas por insectos transmisores de paludismo y otras enfermedades (4).

El término Chinchorro se refiere a una playa en Arica, Chile, donde el arqueólogo alemán Max Uhle, descubrió numerosos cuerpos de momias durante sus excavaciones en 1910. En 1919 Uhle realizó un estudio donde describía las momias de los aborígenes de Arica, dividiéndolas en tres grupos:

- Momias de tipo simple
- Momias de preparación complicada
- Momias cubiertas de barro

En este trabajo se contó con momias del primer tipo las cuales se caracterizan por no tener ninguna evidencia de tratamiento interno del cuerpo (Momificación natural). Hoy en día es usual encontrar momias de este tipo, que fueron secadas por el calor generado por el sol con todos sus órganos intactos debido solo a la falta de agua (5).

Iniciadores utilizados

Los dos sistemas más importantes recientemente utilizados en la amplificación de ADN son los minicírculos de los cinetoplastos y las secuencias satélites (6). Experimentos anteriores han sugerido que la amplificación de ADN de los minicírculos de los cinetoplastos es un muy buen método ya que es capaz de detectar la presencia de una sola célula de parásito en 20 ml de sangre (6).

Con el fin de contar con un método sensible y específico para la detección del parásito en muestras biológicas, se usaron 2 oligonucleótidos (S35-S36) con base en las regiones conservadas encontradas en los minicírculos de *T. cruzi*. Estos iniciadores tienen la

siguiente secuencia:

S35

5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'y

S36

5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3 -

MATERIALES Y METODOS

Material de estudio

El material momificado fue provisto por el Dr. Arthur Aufderheide (Paleobiology Laboratory, University of Minnesota, School of Medicine, Duluth, U.S.A.).

Las muestras fueron obtenidas de restos humanos provenientes del desierto de Atacama, Norte de Chile y Sur del Perú. Las condiciones áridas en esta región producen comúnmente momificación espontánea por una rápida desecación de los restos humanos enterrados.

Las momias usadas en este estudio fueron seleccionadas al azar dentro de las muestras enviadas por el Dr. Aufderheide. La antigüedad del material abarca desde 7500 años antes de nuestra era hasta tiempos coloniales.

Arqueológicamente pertenecían a 7 grupos culturales:

- La cultura Chinchorro data de 7500-2000 AC.
- La cultura Alto Ramírez data de 1000-350 AC.
- La cultura Cabuza data de 350-1000 DC.
- La cultura Maitas Chiribaya data de 900-1250 DC.
- La cultura Gentilar data de 1200-1350 DC.
- Colonial
- San Lorenzo
- Camarones-9

Se escogieron 26 de 29 individuos proporcionados y se trabajaron preferencialmente tejidos como corazón, esófago y colon.

El número de muestras analizadas fue 40, correspondiente a diferentes tejidos repartidos en los 26 individuos. El control negativo (tejido de momificación espontánea de adolescente del desierto de Egipto) incluye muestras de hígado, músculo y pulmón, mientras que del control positivo (Fornaciari) se analizaron muestras de los siguientes tejidos: recto, colon transversal, corazón y esófago.

Como un control positivo adicional se usó ADN de *T. cruzi* de cultivo, cepa Y-Sousa.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo mediante el método tradicional de fenol-cloroformo o mediante un kit comercial, siguiendo el protocolo indicado en el manual.

Amplificación de ADN de *T. cruzi*

En cada reacción de amplificación de 20 l se usaron: Buffer 10X, MgCl₂, KCl, dNTPs, S35 y S36, Taq Polimerasa y 2 l del ADN extraído. Para las reacciones de PCR se usó un termociclador MJ Research PTC-100 programado con el siguiente perfil térmico: 35 ciclos de 94C 1 minuto, 60C 1 minuto, 72C 1 minuto; una denaturación inicial de 5 minutos a 94C y una extensión final de 5 minutos a 72C. En todas las reacciones de amplificación se incluyeron controles positivos con ADN del parásito de cultivo y blanco de reacción (mezclas de reacción sin ADN).

Después de la amplificación, los productos de PCR obtenidos fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 2% y observados bajo luz ultravioleta, los productos de PCR una vez mezclados con el tampón de carga fueron sembrados en los diferentes pozos. Se conectó la cubeta a la fuente de poder y se seleccionó el voltaje (70V, constante). Una vez el ADN completó el recorrido, se tomó una fotografía del mismo.

Digitalización y análisis de imágenes

Para obtener un estimativo del tamaño molecular de las bandas, se sirvieron en cada gel marcadores de peso molecular. De esta forma el peso de un fragmento de ADN se puede estimar comparando su movilidad con las de los estándares corridos en el mismo gel. La distancia de cada estándar de peso molecular es medida desde la parte superior del gel, obteniéndose así una curva de calibración. El peso molecular de la banda correspondiente al producto de PCR obtenido, se interpola después con base a su distancia de migración.

Una vez tomadas las fotos de los geles, se procedió a digitalizarlas con ayuda de un scanner. Las imágenes digitalizadas fueron analizadas con ayuda de un computador Macintosh Quadra 605 utilizando el programa NIH-Image.

RESULTADOS

Extracciones de ADN

Se llevaron a cabo experimentos para determinar el método óptimo para la extracción de ADN, además de prevenir cualquier problema resultado de la inhibición de la amplificación en cualquiera de las muestras de ADN purificado. Dos métodos de extracción fueron probados y comparados: purificación por columna (Kit Pharmacia Biotech) y extracción con el método clásico de fenol-cloroformo. Según los resultados obtenidos hay una pequeña diferencia entre los dos métodos, ya que con el kit además de obtenerse amplificación para todos los controles positivos de momia extraídos, presentaron también amplificación otras muestras problema, para las cuales las reacciones de PCR a partir de ADN extraído con el método de fenol-cloroformo fueron negativas. Hay que mencionar también que se observó un precipitado blanco en la mayoría de las muestras extraídas con el método clásico; es posible que este precipitado corresponda a un exceso de proteínas.

Condiciones óptimas para la PCR

Se realizaron ensayos preliminares para establecer un protocolo en el cual las reacciones fueran reproducibles y la amplificación de buena calidad. Las reacciones para la estandarización de la técnica, comprendían ensayos con diferentes concentraciones de MgCl₂ iniciadores y Taq polimerasa, así como diferentes temperaturas de anillaje y número de ciclos.

Se realizaron titulaciones del ion magnesio para determinar cual era su concentración óptima en la reacción de PCR. Después de realizar varios ensayos se encontró que 2 mM era la concentración final, con la que se obtenían las bandas más nítidas.

La temperatura de anillaje es otro factor que influye directamente sobre la especificidad de la PCR (7). Así cuando la temperatura es alta, aumenta la especificidad del anillaje, mientras que al disminuir la temperatura disminuye también la especificidad. Se encontró que la temperatura de anillaje más apropiada era de 60°C.

Para escoger el ADN de cultivo que sería el control positivo para todas las reacciones, se realizaron numerosas amplificaciones con diferentes ADNs de *T. cruzi* de cultivo proporcionados por el CIMPAT.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de amplificación con el control de ADN de tripanosoma de cultivo, se procedió a hacer las reacciones de PCR con las muestras problema (extracciones de ADN de tejido de momia). Catorce de las 40 muestras analizadas, presentaron amplificación del fragmento esperado 330 bp.

DISCUSION DE RESULTADOS

Los orígenes de la mayoría de las enfermedades humanas se pierden en la bruma de la historia (5). Sin embargo en la literatura sobre el hombre antiguo se encuentra que éste conocía las infecciones parasitarias de su medio. Tal es el caso de médicos de Mesopotamia, quienes diagnosticaron la hematuria y hasta atribuyeron su causa a una lombriz, o indígenas de México y Perú que utilizaron antihelmínticos (8).

Sir Armand Ruffer fue el primero en mostrar que las momias pueden ser utilizadas para el estudio de las enfermedades del hombre en las civilizaciones antiguas (9); de hecho documentó por primera vez en 1910, la presencia de parásitos en restos momificados (8). Con mayor razón, con la tecnología actual es posible realizar análisis directos de los cuerpos de individuos que murieron hace miles de años.

El genoma de *T. cruzi* se caracteriza por su abundancia en secuencias de ADN repetitivo, el cual ha sido objeto de estudio y ha sido usado como blanco para la detección e identificación del parásito; aunque una gran parte de estos elementos repetitivos se encuentra en el ADN ribosomal podemos encontrarlo también en los minicírculos de los cinetoplastos; este es un punto de partida adecuado para el análisis e identificación de muestras infectadas con el parásito. Existe una gran razón para la escogencia de esta secuencia de ADN reiterada y es que es esencial tener un número grande de copias de la secuencia blanco para la amplificación por PCR, pues el ADN de copia única es más difícil de ser detectado (10).

Como se indicó anteriormente, en el caso de *T. cruzi* las regiones conservadas de los minicírculos están presentes en cuatro repeticiones situadas a 90 grados unas de otras (11) estas mini repeticiones proporcionan secuencias especie-específicas, apropiadas como iniciadores en las reacciones de amplificación de la región adyacente de 330 bp.

Algunos autores también han enfocado sus estudios en la identificación de *T. cruzi* en tejidos momificados a través de técnicas con microscopio electrónico e inmunoquímicas.

Los resultados del presente estudio confirman la aplicación del PCR (12) en situaciones donde otros métodos aunque muy sensibles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas no son viables como es el caso del estudio en momias.

La primera parte del estudio se inicia a partir de ensayos con los controles positivos de ADN de *T. cruzi* de cultivo y el blanco de reacción; se procedió a tener un riguroso control sobre cualquier posible factor de contaminación; incluso se probaron reacciones de amplificación con 25 y 30 ciclos, ya que la disminución del número de ciclos en la reacción de PCR es importante cuando se tienen problemas de contaminación por eventos raros de amplificación en el control negativo (13). De esta forma, se evitaron interpretaciones erróneas de falsos positivos.

Se obtuvieron resultados diferenciales en la amplificación según el método de extracción utilizado. Esto puede ser debido a dos factores; el primero es que se deben realizar varias extracciones de un mismo tejido, ya que la probabilidad de encontrar nidos de amastigotes en los mismos no es muy alta por lo que es probable que solamente con alguno de los dos métodos se acertó a tomar el pedazo de tejido donde se encontraban tripanosomas. Es importante notar que los tripanosomas normalmente son abundantes sólo en la fase aguda de la enfermedad, mientras que en la fase crónica los protozoos circulantes son mínimos.

El otro punto a resaltar es en el que convergen algunos autores acerca de como se desarrolla la enfermedad de Chagas. Las dos grandes hipótesis de la fisiopatología de Chagas son que la enfermedad es causada por daño directo del parásito o que es causada indirectamente por una respuesta autoinmune precipitada por la infección crónica con *T. cruzi* (14). Si el daño es producido directamente por el parásito, altos niveles del mismo deberían estar presentes en los tejidos en infecciones crónicas, por lo tanto habría mayor posibilidad de que la prueba de PCR diera positiva. Si los niveles del parásito no son tan altos, como en el caso de una reacción autoinmune, se hace necesario un mayor número de reacciones de PCR para la detección de *T. cruzi*. Nuestros resultados indirectamente apoyan la posibilidad de una etiología autoinmune.

La amplificación de fragmentos específicos de los minicírculos del kADN provee un método sensible y específico para la detección de *T. cruzi*. Por medio de este estudio se corroboró la eficiencia de la reacción de amplificación con los iniciadores.

Presencia de un exceso de ADN humano no tiene efecto en la amplificación

La PCR puede ser usada para amplificar fragmentos, específicos de los minicírculos de kADN para la detección de *T. cruzi* en presencia de un exceso de ADN humano ya que este no interfiere con el proceso de amplificación del producto de 330 bp. La presencia de bandas adicionales de peso molecular bajo, presentes en las muestras e incluso en los controles negativos, son probablemente debidas al auto anillaje de los iniciadores.

Cabe anotar que adicional a las bandas de 330 bp y de 660 bp (que es la obtenida por amplificación continua de dos regiones variables contiguas), se observó recurrentemente una banda situada entre los 700 y 800 bp. Esta banda podría presentarse por inespecificidades.

Adaptación temprana *Triatoma infestans* a hábitats humanos

La transición de una subsistencia basada en la caza y recolección a un estado de sedentarismo pudo darse alrededor de los 4000 A.C. (21). La agricultura y la ganadería son quizá los factores más significativos en el asentamiento de las poblaciones humanas tempranas. Este hecho favorece por su lado que los parásitos puedan establecerse y adaptarse a nuevas condiciones debido a las continuas reinfecciones sobre el hospedero (15). Carpintero y Viana, 1980 han especulado sobre la adaptación de los triatomíneos a las viviendas humanas y proponen que ésta tuvo lugar muy temprano en un foco de las sierras centrales de Argentina, así como sur de Perú y Bolivia. Además la antigua costumbre de cría de cobayos, de los aborígenes andinos para su consumo, pudo favorecer la adaptación de Triatomas a los hábitats humanos. Por otro lado, grandes mamíferos como los camélidos americanos, probablemente fueron hospederos de *T. infestans* antes de ser domesticados por el hombre.

La presencia de la enfermedad de Chagas en poblaciones ancestrales parece ser un evento netamente accidental, ya que en la medida en que el hombre fue entrando en contacto con los focos naturales del ciclo parasitario, provocó un desequilibrio ecológico (12) forzando a los triatomíneos a ocupar viviendas humanas; de esta forma los insectos accedieron a una gran oferta de recursos alimenticios y protección de predadores y las inclemencias del tiempo. Comienza así un largo periodo de adaptación

de *T. infestans* al ambiente humano favorecida por las migraciones de estos antiguos pobladores y la colonización de nuevas tierras.

Sin embargo, también es posible que las primeras poblaciones con casos de Chagas hubieran adquirido la enfermedad antes de lograr un sedentarismo definitivo, debido a la ingestión de animales muertos que ya estaban infectados con *T. cruzi*.

Otro punto que sustenta la presencia de la enfermedad de Chagas como evento recurrente en estas poblaciones precolombinas del sur del continente, es el hallazgo de cerámicas y artefactos culturales que hacen pensar que se conocía el insecto vector de la enfermedad. Además el material de construcción de viviendas más ampliamente disponible fue la tierra (adobe) con gran cantidad de grietas en las paredes generando un refugio ideal para los insectos.

Aunque parece un número alto que 12 de 26 individuos diferentes (46%) resultaran con amplificación positiva para *T. cruzi*, cifras actuales muestran que la población infectada por este parásito en Chile es del 10% y que otro 15% está expuesta a adquirir la infección (12).

Evidencia histopatológica de Chagas

Las megalias fueron las complicaciones más frecuentes, observadas en varios de los individuos estudiados (16). Sin embargo, se necesitan más estudios para determinar la relación entre la cardiomegalia y la enfermedad, ya que ésta pudo ser fisiológica debido a que estos individuos habitaban el Altiplano. Este hecho parece bastante probable, según los resultados obtenidos (9), en su estudio sobre enfermedades respiratorias en habitantes precolombinos del norte chileno.

Cabe resaltar que este trabajo confirma que los métodos moleculares son una gran herramienta que permite complementar estudios sobre el pasado, los cuales son muy importantes para entender y resolver los problemas del futuro. Por medio del proyecto de tripanosomosis en momias se puede estudiar la evolución de la enfermedad a través de los años.

Es así como este estudio demuestra que los residentes de la costa sudoeste de Sur América sufrieron de tripanosomosis americana desde hace por lo menos 4000 años.

CONCLUSIONES

El acceso al ADN de parásitos protozoarios en restos humanos, mediante la amplificación por PCR, abre una gran puerta para una nueva área en la búsqueda e identificación de las enfermedades que afectaron a poblaciones ancestrales, como es el caso de la enfermedad de Chagas.

Este estudio indica que la enfermedad de Chagas pudo ser común en el norte de Chile precolombino, siendo quizá ésta una importante causa de muerte dentro de la población. La importancia de las enfermedades en el control de las poblaciones, demanda que más atención sea dada al estudio de las evidencias disponibles en las infecciones del hombre temprano.

Bibliografía

1. Allison M. J., Focacci G., Arriaza B., Standen V., Rivera M., (1984)- Chinchorro, Momias de Preparación Complicada: Métodos de Momificación. Revista Chungará., N° 3: 15-173.
2. Allison M. J., Focacci G., Gerszten G., Fouant M., Cebelin M., (1982). La Sífilis una enfermedad Americana. Revista Chungará., N° 9- 275-284.
3. Avila H., Goncalves A. M., Saad N., Morel C. M., Simpson L., (1990). Schizodeme
4. Carpintero D. J., Viana E. J., (1980). Hipótesis Sobre el Desarrollo de la Tripanosomiasis americana- Casa de la Cultura Ecuatoriana., 73-92-
5. Centurion-Lara A., Barret L., Van Boris W. C. (1994). Quantitation of Parasitaemia by competitive PCR amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *T. cruzi*. The Journal of Infectious Diseases. 170: 1334-1338.
6. Cockburn T. A., (1971). Infectious Diseases in Ancient Populations. Current Anthropology., 12(1): 4@2.
7. Erlich H. A., (1989). PCR Technology; Applications and Principles of DNA Amplifications. New York, Stockton Press.
8. Fontana D., Allison M. J., Gerszten E., Arriaza B., (1983). Enfermedades Respiratorias Agudas en los Habitantes Precolombinos de; Norte Grande Chileno. Revista Chungará., No 11: 153-160.
9. Fouant M., Allison M., Gerszten E., Focacci G., (1982). Parásitos Intestinales entre los Indígenas Precolombinos. Revista Chungará., No: 285-299.
10. Guhl F., Jaramillo C. A., Yockteng R., Vallego G. A. Cardenas-Arroyo F., (1997). Trypanosoma cruzi DNA in Human Mummies. The Lancet., 349 (9062): 1370.
11. Monteón V. M., Reyes P. A., Rosales J. L., (1994)- Detección de *T. cruzi*, en Muestras Experimentales por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa, Arch Inst Cardiol Mex., 64- 135-143.
12. Moser D. R., Kirchoff L., Donelson J. E. (1989). Detection of *T. cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. Journal of Clinical

- Microbiology. 1477-1482.
13. Muñoz I., (1986). Aportes a la Reconstitución Histórica del Poblamiento Aldeano en el Valle de Azapa (Arica-Chile). *Revista Chungará.*, N°16-17, 307- 322.
 14. Standen, V., Allison, M., Arriaza, V. (1984). Patologías óseas de la población Morro-1, Asociada al complejo Chinchoroae: Norte de Chile. *Revista Chungara.*, No. 13: 175-185.
 15. Vallejo G., (1998). Estudios comparativos entre las secuencias de kADN de *T. cruzi* y *T. rangeli* y su aplicación en el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana. *Actual. Biol.*, 20 (68): 43-56.
 16. Wincker P., Bosseno M., Britto C., Yaksic N., Cardoso M. A., Morel C., Breniere S. F. (1994). High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *T. cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *Federation of European Microbiological Societies*, 0378-1097 (94) 00466-8.