



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**“DETERMINACIÓN DE LA CARGA PARASITARIA DE *Trypanosoma cruzi* EN ADN
DE SANGRE TOTAL Y CAPA LEUCOCITARIA, MEDIANTE PCR
CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL, EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD DE
CHAGAS CRÓNICA”**

**DANIELA KARINA LIEMPI CATRILEO
TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN PARASITOLOGÍA**

**Director de Tesis: Prof. Dra. Inés Zulantay Alfaro
Co-Director: Dr. Nelson Varela Figueroa
Asesor estadístico: Dr. Mauricio Canals Lambarri**

2022



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

DANIELA KARINA LIEMPI CATRILEO

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Parasitología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 06 de septiembre de 2022

**Prof. Dra. Inés Zulantay Alfaro
Directora de Tesis
Santiago**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Werner Apt

Prof. Dra. Carezza Botto

**Prof. Dr. Fernando Fredes
Presidente Comisión**

Dedicatoria

A mi familia, en especial a mis padres...

Agradecimientos

Muchas gracias a la Dra. Inés Zulantay y al Dr. Werner Apt por ser los principales guías en este programa, por abrirme las puertas de su laboratorio en este tiempo y darme la posibilidad de trabajar con ellos en este proyecto en el cuál tuve muchas satisfacciones.

Gracias también a los diferentes docentes que me hicieron clases en el Magíster, los cuáles fueron muy importantes para fortalecerme como profesional del área de la Parasitología, así como también a la Comisión por sus comentarios y sugerencias realizadas para enriquecer este trabajo, y al Dr. Nelson Varela y al Dr. Mauricio Canals por su colaboración en esta tesis.

Agradecer también a las personas de Combarbalá, región de Coquimbo, quienes estuvieron dispuestos a participar de este estudio y que con entusiasmo y paciencia esperaron sus resultados. Gracias también a quienes participan haciendo una gran labor en cada salida a terreno para recolectar estas muestras y con quienes pude compartir: Anita, Sandro y María.

También agradecer a Andrés y Nicolás quienes participaron y colaboraron activamente en el proyecto, sobre todo cuando se me complicaba viajar a Santiago por el trabajo.

Y a todos quienes día a día estuvieron y siguen estando conmigo apoyándome en todos mis proyectos, mis padres, hermanos y mi compañero de vida Rodrigo.

Esta tesis fue financiada por el **proyecto internacional EU-LAC Health16 T02-0108, FONDEF-FONIS** llamado “*Hacia el tratamiento personalizado de la enfermedad de Chagas. Caracterización molecular de pacientes y parásitos*”.

Índice

Contenido	Pág.
Resumen	7
Abstract	9
1. Introducción	11
1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas	11
1.2 Características del agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad y patogenia	12
1.4 Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile	13
1.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	14
1.6 Tratamiento de la enfermedad de Chagas	15
1.7 Herramientas moleculares aplicadas al diagnóstico parasitológico de la ECh.....	16
1.8 Propósito del estudio	17
2. Hipótesis	18
3. Objetivos	18
3.1 Objetivo general	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. Metodología	19
4.1 Diseño del estudio	19
4.2 Criterios de inclusión	19
4.3 Consideraciones Éticas y Consentimiento Informado	20
4.4 Población en estudio	20
4.5 Caracterización epidemiológica de la población en estudio	20
4.6 Obtención y procesamiento de las muestras biológicas	21
4.7 Extracción de ADN	21
4.8 Determinación de concentración y pureza del ADN extraído	22
4.9 Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i> y elaboración de curva estándar	22
4.11 Cuantificación de <i>T. cruzi</i> mediante sistema qPCR-TaqMan®	24
4.11 Análisis estadístico	25
4.12 Equipos utilizados	26

5. Resultados	27
5.1 Concentración de ADN según tipos de muestra	27
5.2 Índice de pureza de ADN a A260/280 nm y A260/230 nm, según grupos de estudio	28
5.3 Curvas de calibración de <i>Trypanosoma cruzi</i> utilizadas en qPCR-Taqman®	30
5.4 Control de reacción IPC	32
5.5 Detección de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante qPCR-Taqman® en los grupos de estudio	32
5.6 Concordancia de resultados qPCR-Taqman® para <i>Trypanosoma cruzi</i> entre los distintos tipos de muestras	33
5.7 Detección de ADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> , mediante qPCR-Taqman® en los distintos tipos de muestras	34
5.8 Cuantificación de la carga parasitaria (par-eq/mL) de <i>Trypanosoma cruzi</i> según tipos de muestra de estudio, mediante qPCR-Taqman®	36
5.9 Positividad y carga parasitaria (par-eq/mL) de <i>Trypanosoma cruzi</i> al analizar simultáneamente los tres tipos de muestras en estudio	38
5.10 Asociación de la concentración de ADN total con la carga parasitaria obtenida ...	40
6. Discusión	42
7. Conclusiones	52
8. Referencias	53
9. Anexos	63

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: A pesar de las mejoras en las herramientas diagnósticas para detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre humana, y el uso de variadas metodologías descritas para la obtención y procesamiento de muestras, el aislamiento del parásito desde el torrente sanguíneo en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (ECh) continúa siendo un desafío, debido a la dinámica de la parasitemia. Previo a la detección de ADN, existen variables como el volumen y fraccionamiento de la muestra, uso de anticoagulantes y/o preservantes, almacenamiento, incubación, entre otras, que pueden influir tanto en la concentración y pureza del ADN extraído, así como en el resultado de la carga parasitaria. Este estudio propone evaluar diferentes metodologías de obtención y procesamiento de muestras sanguíneas, para determinación de carga parasitaria de *T. cruzi* mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) en pacientes con ECh crónica.

HIPÓTESIS: Las cargas parasitarias de *T. cruzi* determinadas mediante qPCR, en capa leucocitaria (CL) y sangre total mezclada con Guanidina-EDTA (GE) sin hervir, son mayores a la determinada en sangre en GE hervida, debido a las impurezas generadas en el proceso de calentamiento de esta última y a la mayor concentración parasitaria en capa leucocitaria resultante de la centrifugación.

OBJETIVO: Comparar, mediante la aplicación de qPCR, la carga parasitaria circulante de *T. cruzi* en ADN extraído de muestras de sangre total mezclada con GE (hervida y no hervida) y en capa leucocitaria obtenida de individuos con ECh crónica.

METODOLOGÍA: Se analizaron muestras de sangre periférica de 53 pacientes adultos confirmados serológicamente con ECh crónica y sin tratamiento etiológico, procedentes de la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, Chile. Las muestras de sangre fueron recolectadas mediante una punción venosa y distribuidas en un tubo sin aditivos (para estudio serológico), un tubo con anticoagulante EDTA y un tubo con GE. Se separó la capa leucocitaria de las muestras en EDTA, mientras que las muestras de sangre en GE fueron divididas en alícuotas hervidas y no hervidas. Se realizó, bajo el mismo protocolo, extracción de ADN de las muestras de sangre en GE hervida, GE no hervida y capa leucocitaria. Mediante espectrofotometría se evaluó la concentración y pureza del ADN obtenido y, posteriormente, se aplicó el sistema qPCR-Taqman® para determinar la carga parasitaria de *T. cruzi* en los tres tipos de muestras. En el análisis estadístico se aplicó la prueba de t de Student para muestras

pareadas y corrección de Bonferroni, chi cuadrado secuencial (χ^2) y coeficiente de correlación de Spearman (r_s).

RESULTADOS: La concentración de ADN en la capa leucocitaria fue mayor al obtenido en muestras de sangre total en GE hervida y GE no hervida. El ADN de capa leucocitaria presentó mayor pureza que el ADN obtenido de sangre en GE hervida y GE no hervida a A260/280, mientras que a A260/230 no hubo diferencias significativas. Se detectó ADN parasitario circulante en muestras de 26 pacientes (49%), siendo 19 muestras positivas en GE hervida (35,8%), 17 en GE no hervida (32%) y 18 de CL (34%) ($p=0,92$). En 10 pacientes (18,9%), se detectó ADN parasitario tanto en GEH, GENH y CL y, en 7 de ellos (13,2%) fue posible cuantificar la parasitemia ($\geq 0,1$ par-eq/mL), existiendo una correlación positiva y significativa entre la concentración de ADN total y la carga parasitaria obtenida en las muestras, siendo más alta en capa leucocitaria ($r_s=0,96$, $p=0,002$).

CONCLUSIONES: Las bajas cargas parasitarias obtenidas en el presente estudio, continúan siendo un importante desafío para el diagnóstico parasitológico de la ECh crónica. No se evidenció diferencias significativas entre las parasitemias obtenidas en los tres tipos de muestras analizadas. Se estableció una correlación positiva y significativa entre la concentración de ADN total y la carga parasitaria obtenida en todos los tipos de muestras, siendo mayor en las muestras de capa leucocitaria.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Despite improvements in diagnostic tools for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples, and the use of several methodologies described for obtaining and processing samples, the isolation of the parasite from the bloodstream in the chronic phase of Chagas disease (ChD) continues to be a challenge, due to the parasitaemia dynamics. Prior to DNA detection, there are variables such as the volume and sample fractionation, use of anticoagulants and/or preservatives, storage, incubation, among others, that can influence both the concentration and purity of the extracted DNA, as well as the result of parasitic load. This study proposes to evaluate different methodologies for obtaining and processing blood samples, to determine the parasitic load of *T. cruzi* by real-time quantitative PCR (qPCR) in patients with chronic ChD.

HYPOTHESIS: The parasitic loads of *T. cruzi* determined by qPCR, in buffy coat (BC) and whole blood mixed with Guanidine-EDTA (GE) without boiling, are greater than that determined in blood in boiled GE, due to the impurities generated in the heating process from the latter, and the highest parasitic concentration in the buffy coat resulting from centrifugation.

OBJECTIVE: To compare, through the application of qPCR, the circulating parasitic load of *T. cruzi* in DNA extracted from samples of whole blood mixed with GE (boiled and non-boiled) and in buffy coat obtained from individuals with chronic ChD.

METHODOLOGY: Peripheral blood samples from 53 serologically confirmed adult patients with chronic ChD and without etiological treatment, from the commune of Combarbalá, Coquimbo Region, Chile, were analyzed. Blood samples were collected by venipuncture and distributed in a tube without additives (for serological study), a tube with EDTA anticoagulant, and a tube with GE. Buffy coat was separated from EDTA samples, while GE blood samples were divided into boiled and non-boiled aliquots. Under the same protocol, DNA extraction was performed from blood samples in boiled GE, non-boiled GE and buffy coat. Using spectrophotometry, the concentration and purity of the DNA obtained was evaluated and, subsequently, the qPCR-Taqman® system was applied to determine the parasitic load of *T. cruzi* in the three types of samples. In the statistical analysis, the Student-t test for paired samples and Bonferroni correction, sequential chi square (χ^2) and Spearman's correlation coefficient (r_s) were applied.

RESULTS: DNA concentration in the buffy coat was higher than that obtained in whole blood

samples in boiled GE and non-boiled GE. Buffy coat DNA was higher in purity than DNA obtained from blood in boiled GE and non-boiled GE at A260/280, while at A260/230 there were no significant differences. Circulating parasitic DNA was detected in samples from 26 patients (49%), with 19 positive samples in boiled EG (35.8%), 17 in non-boiled EG (32%) and 18 in BC (34%) ($p=0,92$). In 10 patients (18.9%), parasitic DNA was detected in all GEH, GENH and BC, and in 7 of them (13.2%) it was possible to quantify parasitaemia (≥ 0.1 par-eq/mL). There was a positive and significant correlation between DNA concentration and parasite load obtained in the samples, being higher in the Buffy coat ($r_s=0,96$, $p= 0,002$).

CONCLUSIONS: The low parasite loads obtained in the present study continue to be an important challenge for the parasitological diagnosis of chronic ChD. Non-significant differences between the parasitemias obtained in the three types of samples analyzed were established. There was a positive and significant correlation between DNA concentration and parasite load obtained in all types of samples, being higher in buffy coat samples.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (ECh) o tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que infecta mamíferos y triatomíneos. Puede ser adquirida o congénita, comprometiendo en grado variable diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y tubo digestivo (1).

La transmisión de *T. cruzi* se produce principalmente mediante insectos vectores de la subfamilia Triatominae, donde en áreas endémicas de transmisión vectorial, se transmite por especies de tres géneros: *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*, ampliamente distribuidos en Latinoamérica, desde México hasta el sur de Argentina y Chile, habitando tanto en áreas boscosas como más secas (2,3). Otros mecanismos de transmisión incluyen: transmisión oral (a través de alimentos), transfusión sanguínea, transmisión de madre a hijo (congénita), trasplante de órganos y transmisión por accidentes de laboratorio (4). Mecanismos tales como el congénito, tienen un papel principal en países no endémicos y una importancia creciente en áreas endémicas (2,5,6).

Esta antropozoonosis endémica en 21 países de Latinoamérica, se vincula con aspectos socioeconómico-culturales deficientes, considerándose entre las enfermedades tropicales más desatendidas en América Latina (4,7,8), debido a las brechas de investigación y desarrollo relacionadas con el diagnóstico y tratamiento (9). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que entre 6 y 7 millones de personas están infectadas en todo el mundo, principalmente en Latinoamérica (4), ocasionando más de 10.000 muertes al año (3,10). Esta parasitosis, se ha convertido en un problema de salud pública global en las últimas décadas, debido a la migración de personas infectadas desde áreas rurales a urbanas y flujos migratorios que han expandido la enfermedad a otros continentes (4,11).

1.2 Características del agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

En los hospederos mamíferos, en el insecto vector y en los medios de cultivo, *T. cruzi* presenta tres formas de desarrollo con diferentes características morfológicas: epimastigote, tripomastigote y amastigote (1). Los dos últimos se presentan en el ser humano infectado (2).

El tripomastigote de aspecto fusiforme, mide 20-25 x 2 μm , posee un citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso, un cinetoplasto subterminal posterior al núcleo, del cual emerge

un flagelo que recorre al parásito y se extiende a lo largo del borde exterior de una membrana ondulante. Presenta gran movilidad, no se multiplica y se ubica en sangre de vertebrados y en el intestino posterior de los triatomíneos. Corresponde a la forma infectante y de diseminación en mamíferos (1,2). El amastigote, no posee flagelo y se multiplica por fisión binaria dentro de varios tipos celulares, prefiriendo las de origen mesenquimatoso (2). Su forma es esférica u ovalada, inmóvil y mide 2-4 μm . Es la forma de reproducción intracelular en los hospederos vertebrados, mientras que, el epimastigote es la forma de reproducción del parásito en el vector y los medios de cultivo (1).

Los tripomastigotes metacíclicos son liberados con las heces del insecto vector, mientras que los amastigotes y tripomastigotes del torrente sanguíneo se liberan de las células infectadas del hospedador vertebrado después de un ciclo de vida intracelular complejo (12).

Además, *T. cruzi* presenta alta diversidad genética y fenotípica, y se ha clasificado en seis clados cercanos (TcI a TcVI) conocidos como unidades de tipificación discretas (DTU por su sigla en inglés). Esta diversidad genética se ha relacionado con la distribución geográfica, patogenicidad, las características clínicas y la respuesta al tratamiento (2).

1.3 Manifestaciones clínicas de la enfermedad y patogenia

La ECh se presenta en dos etapas: aguda y crónica (11). La fase aguda inicial dura alrededor de dos meses después de la infección. Durante esta fase, un gran número de parásitos circula en la sangre, los síntomas son variables, y en la mayoría de los casos, están ausentes o son leves e inespecíficos, resolviéndose espontáneamente luego de algunas semanas. El tratamiento apropiado puede eliminar el parásito durante esta fase, pero la infección sólo se diagnostica en el 1% al 2% de las personas infectadas (2,4,13). Posteriormente, sobreviene la fase crónica, inicialmente con una forma indeterminada o latente. Aproximadamente el 70% de las personas seropositivas son asintomáticas, mientras que, entre el 20-30% desarrollan anomalías cardíacas (miocardiopatías, arritmias), 10% trastornos digestivos (megavísceras) varios años o décadas después. También, 3-4% puede desarrollar alteraciones neurológicas en casos de reactivación de la enfermedad bajo inmunodepresión, y 2-3% puede presentar formas mixtas (cardíacas y digestivas) (2,3,13,14). Además, cada año, 2% al 3% de las personas sintomáticas presentan manifestaciones que pueden evolucionar rápidamente a muertes repentinas (13).

Respecto a la patogenia, el parásito juega un papel fundamental en la génesis y desarrollo de las

lesiones en el hospedero induciendo secuencialmente: lisis celular, una respuesta inflamatoria y fibrosis. Estos procesos pueden ocurrir en muchos órganos, pero se observan con mayor frecuencia e intensidad en corazón y sistema digestivo (15). Tanto en la fase aguda como crónica, la presencia del parásito y la respuesta inmune inflamatoria a la infección, originan las diversas lesiones y el progreso de la enfermedad (2,16).

Numerosas moléculas participan en el reconocimiento entre el parásito y la célula hospedera (12). En la fase aguda, el daño orgánico es secundario a la acción directa del parásito y a la respuesta inflamatoria aguda, mientras que el control altamente eficiente del parásito es resultado de una respuesta inflamatoria intensa con producción activa de anticuerpos y activación de la respuesta inmune innata por citocinas proinflamatorias Th1 como factor de necrosis tumoral α e interferón γ . En la fase crónica, la inflamación es el principal determinante de la progresión, mientras que otros factores potenciales son la virulencia de la cepa de *T. cruzi* y el tropismo tisular. En la fase indeterminada predomina una respuesta inmune reguladora, caracterizada por producción de interleucinas (2). Por tanto, interacciones complejas entre la genética del parásito y el hospedero, factores ambientales y epidemiológicos, determinan el resultado de la infección (13).

1.4 Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile

En Chile, el área endémica se distribuye entre las Regiones Arica-Parinacota (18°30'S) y O'Higgins (34°36'S), con 873.415 personas en riesgo, principalmente en áreas rurales y periurbanas (3,17). Los vectores biológicos presentes en la zona endémica son: *Triatoma infestans* de hábitos domésticos y, *Mepraia spinolai*, *M. gajardoi* y *M. parapatrica* de hábitos silvestres (3,18,19).

La ECh en Chile es de notificación obligatoria y de vigilancia epidemiológica universal. En el año 2020, el Decreto Supremo N°7, separó la notificación universal de la ECh de carácter inmediato para casos agudos y de carácter diaria para casos crónicos (20). En los últimos años, la pesquisa de la infección ha aumentado, especialmente en mujeres gestantes y donantes en general (21). Esta problemática se enfrenta mediante un Sistema de Vigilancia Epidemiológica con cobertura nacional, un Programa de Control Vectorial que ha permitido disminuir los índices de infestación domiciliaria por *T. infestans* bajo el 1% y un control de transmisión transfusional, que desde el año 2008 considera el tamizaje obligatorio a la sangre donada en

todo el país (17,20). Esto último, con el fin de conseguir la certificación de la interrupción de la transmisión transfusional de *T. cruzi* (6).

La Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017, reportó una prevalencia de seropositividad IgG para la ECh de 1,2% en la población general, mayor a la obtenida en la ENS 2009-2010 (0,7%), y la prevalencia en zonas rurales continúa siendo mayor comparada con zonas urbanas (21,22). En el año 2017 se notificaron 1.507 casos en el país, con una tasa de 8,20 por cada 100.000 habitantes, representando un aumento del 10% con respecto al año 2016. Las tasas más altas se registran en el norte de Chile, llegando a 52,12 casos por 100.000 habitantes en la región de Coquimbo. La población adulta, en especial mayores de 60 años, presentan mayor riesgo de enfermar, mostrando un aumento en las notificaciones, relacionado con la antigüedad de la infección, no pesquisada ni notificada tempranamente. El grupo entre 1 y 15 años presenta las menores tasas de notificación, concordando con la interrupción de la transmisión vectorial, certificada desde el año 1999. Las mujeres muestran mayores tasas de notificación en comparación a los hombres. La mayoría de los casos notificados se encuentra cursando la etapa crónica indeterminada, y en la etapa determinada, la cardiopatía es la manifestación más frecuente (16,23). Se observa un incremento progresivo de la incidencia y una estabilidad en la mortalidad en los últimos 28 años (24,25). Además, estudios recientes informan de las zonas de riesgo de la ECh en Chile y el número reproductivo (R_0), en el contexto del cambio climático global, sugiriendo la importancia de mantener o incrementar los esfuerzos de control (24,26).

1.5 Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico es complejo debido a la dinámica de la parasitemia en las diferentes fases clínicas (27). Los métodos diagnósticos difieren dependiendo de la etapa de infección (28). Así, en la fase aguda, se pueden realizar exámenes parasitológicos directos en muestras sanguíneas, que permiten la observación microscópica directa de tripomastigotes en sangre periférica (1,20). Entre estos métodos, se encuentra el frotis sanguíneo y la gota gruesa, además de los métodos de Strout y microhematocrito, que, mediante la centrifugación sanguínea, permiten concentrar los parásitos aumentando el rendimiento de la observación microscópica. El xenodiagnóstico (XD), método que determina la viabilidad de *T. cruzi* en circulación sanguínea, usando ninfas de triatomíneos alimentadas de sangre del paciente (1,16), ya no es muy utilizado, por considerarse arcaico, operador dependiente (29) y es rechazado por algunos pacientes (3). Los

métodos moleculares, en cambio, detectan el parásito en todas las fases de la enfermedad (27) y debido a su mayor sensibilidad proporcionan resultados positivos en pacientes infectados que dan negativos a las pruebas parasitológicas tradicionales (20). Los más aplicados son PCR (reacción en cadena de la polimerasa) convencional y PCR cuantitativo tiempo real (qPCR) (20,30,31).

En la fase crónica, generalmente, los tripomastigotes no se encuentran en sangre y la parasitemia es baja y fluctuante, por lo que las pruebas serológicas son los métodos diagnósticos recomendados (3,30,32). En esta fase, la enfermedad se diagnostica al detectar anticuerpos IgG específicos contra *T. cruzi* (20), siendo los títulos de anticuerpos elevados (16). Las pruebas serológicas recomendadas incluyen HAI (Hemaglutinación indirecta), IFI (Inmunofluorescencia indirecta), ELISA (Inmunoensayo ligado a enzimas) y/o Western Blot (16,30,33). Actualmente no existe una única prueba estándar de referencia, por lo que la OMS recomienda utilizar dos pruebas serológicas basadas en diferentes principios y que detecten diferentes antígenos, y en el caso de resultados ambiguos o discordantes, se debe utilizar una tercera técnica (30,34,35).

1.6 Tratamiento de la enfermedad de Chagas

El tratamiento etiológico se realiza con fármacos antiparasitarios para combatir el agente parasitario y manejar las complicaciones clínicas. El objetivo es disminuir o eliminar la presencia de *T. cruzi* en las personas infectadas, controlar la transmisión vertical, disminuir la probabilidad de desarrollar patologías cardíacas y digestivas, curar en casos de fase aguda, así como mejorar la calidad de vida y contribuir a la interrupción de la cadena de transmisión en pacientes crónicos (20,31). Así, la progresión de la miocardiopatía chagásica crónica, la peor forma de la enfermedad (alta morbi-mortalidad) puede ser evitada si se trata oportunamente (36). El tratamiento se basa en dos fármacos, nifurtimox y benznidazol; ambos producen efectos secundarios en un 30-85% de los casos (37,38). En los casos agudos adquiridos, se puede obtener la curación en 70-75% de los pacientes, en casos congénitos en el 100% y en casos crónicos en 30-35% (39). Los criterios de curación, especialmente en fase crónica, han sido un tema debatido debido a la dificultad de su demostración, pero la aplicación de métodos moleculares parece estar cambiando la panorámica de ineficacia quimioterapéutica evidenciado en nuevas hipótesis (40,41).

1.7 Herramientas moleculares aplicadas al diagnóstico parasitológico de la ECh

La aplicación de métodos moleculares ha permitido importantes avances para optimizar el diagnóstico, amplificando ADN del parásito desde regiones altamente repetidas del genoma (3,42). Sus múltiples aplicaciones son la detección de casos sospechosos de infección aguda, ECh congénita, ECh accidental, evaluación de eficacia quimioterapéutica, estudios de infección de vectores, entre otras (3,30,42). En muestras sanguíneas de individuos infectados, se ha evidenciado que la PCR posee mayor sensibilidad en relación a otras técnicas diagnósticas, tanto en etapa aguda como crónica (43,44,45). Además, la modalidad cuantitativa o qPCR se ha aplicado con éxito para detectar, cuantificar y/o genotipar *T. cruzi* (13,46,47), siendo útil para caracterizar las cepas circulantes en pacientes infectados (47).

Existen diversos ensayos de PCR para el diagnóstico de la ECh (PCR convencional, PCR anidada, qPCR simple y múltiple) con niveles variables de sensibilidad y especificidad (48,49). La PCR convencional amplifica secuencias específicas de ADN del parásito, presentando alta sensibilidad, pero no es útil para una evaluación cuantitativa. En cambio, diferentes sistemas de qPCR, han demostrado ser muy eficientes en diversos escenarios clínicos, presentando mayor sensibilidad analítica, con límites de detección que fluctúan entre 0,1 y 0,01 parásitos equivalentes/mL (13,32,45,48,50,51), útil para monitorear la progresión de la enfermedad, evaluar la parasitemia en respuesta al tratamiento, estudiar infección congénita, detección temprana de reactivación, genotipificación de *T. cruzi*, entre otros (3,9,42,52,53,54). Además, qPCR brinda tiempos de respuesta más cortos comparado con la PCR convencional y existe menor riesgo de contaminación por arrastre de amplicones (49,55). Además, se utilizan sistemas indicadores fluorescentes que incluyen agentes intercalantes como SYBR® Green y sondas de hibridación específicas como las sondas TaqMan®, que detectan amplicones en la reacción al unirse al ADN doble hebra formado durante cada paso de amplificación, resultando en un aumento de la intensidad de fluorescencia, proporcional a la cantidad de producto de PCR presente (56,57). Se han estandarizado procedimientos de qPCR para detección de *T. cruzi* en muestras de sangre preservadas en buffer 6M Guanidina-HCl/0,2M EDTA, además de realizar validación analítica y evaluación clínica de qPCR multiplex basado en sondas TaqMan® para detectar y cuantificar ADN satélite (ADNsat) o ADN de kinetoplasto (kADN) de *T. cruzi* (13,16,32).

1.8 Propósito del estudio

A pesar de las mejoras en las herramientas de diagnóstico para la detección de *T. cruzi* en muestras de sangre humana y el uso de variadas metodologías descritas para la obtención y procesamiento de las muestras, el aislamiento del parásito del torrente sanguíneo en la fase crónica de la ECh continúa siendo un desafío. Existe un interés creciente en el desarrollo de estrategias y protocolos que permitan una determinación precisa de la carga parasitaria al utilizar técnicas de qPCR, en la sangre de individuos con ECh crónica. Sin embargo, previo a la detección de ADN circulante, existen variables como el volumen y fraccionamiento de la muestra, uso de anticoagulantes y/o preservantes, condiciones de almacenamiento, incubación, entre otras (13,51,58), que podrían influir tanto en la pureza y concentración del ADN extraído desde muestras biológicas, así como en el resultado de la carga parasitaria de *T. cruzi* (16). Si bien, el protocolo estandarizado y mayormente utilizado, corresponde a hervir la sangre mezclada en buffer 6M Guanidina-HCl/0,2M EDTA a 98°C (GE) (13,45,55), el procedimiento de ebullición podría aumentar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras, dando lugar a resultados falsos positivos, por lo que algunos autores optan trabajar con muestras en GE no hervidas (50). Por otro lado, existen pocos estudios, como el de Qvarnstrom *et al.* (2012), donde realizan qPCR en ADN de extraído de capa leucocitaria (CL) además de sangre total, en el cuál reportan que el análisis de la capa leucocitaria aumentaría la sensibilidad de la qPCR. Basado en estas observaciones, este estudio propone evaluar diferentes metodologías de obtención y procesamiento de muestras sanguíneas, para posterior determinación de la carga parasitaria de *T. cruzi*, en pacientes con ECh crónica.

2. HIPÓTESIS

Las cargas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* determinadas mediante qPCR, en capa leucocitaria y sangre total mezclada con GE sin hervir, son mayores a la determinada en sangre en GE hervida, debido a las impurezas generadas en el proceso de calentamiento de esta última y a la mayor concentración parasitaria en capa leucocitaria resultante de la centrifugación.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Comparar, mediante la aplicación de qPCR, la carga parasitaria circulante de *Trypanosoma cruzi* en ADN extraído de muestras de sangre total mezclada con GE (hervida y no hervida) y en capa leucocitaria obtenida de individuos con ECh crónica.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Determinar la concentración y pureza del ADN de la capa leucocitaria, sangre total con GE hervida y sangre total con GE no hervida.

3.2.2 Cuantificar, mediante qPCR, la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* en la capa leucocitaria, en sangre total con GE hervida y en sangre total con GE no hervida.

3.2.3 Establecer si existe correlación entre la concentración de ADN y la carga parasitaria detectada en capa leucocitaria, sangre en GE hervida y sangre en GE no hervida.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño del estudio

Esta tesis fue financiada por el **proyecto internacional EU-LAC Health16 T02-0108, FONDEF-FONIS** llamado “*Hacia el tratamiento personalizado de la enfermedad de Chagas. Caracterización molecular de pacientes y parásitos*”. Corresponde a un estudio comparativo experimental. La población en estudio la constituyeron 53 personas confirmadas serológicamente para ECh crónica y sin tratamiento etiológico, pertenecientes a un área endémica de la enfermedad. Las muestras de sangre periférica fueron recolectadas mediante una punción venosa y distribuidas en un tubo sin aditivos (para pruebas serológicas), un tubo con anticoagulante EDTA y un tubo con GE. Se separó la capa leucocitaria de las muestras obtenidas en EDTA, mientras que las muestras de sangre en GE fueron divididas en alícuotas hervidas (GEH) y no hervidas (GENH). Se realizó la extracción de ADN de las muestras de GEH, GENH y CL, usando el kit E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit Omega Bio-tek (59). En el equipo Nanodrop (Denovix DS-11FX Series Spectrophotometer) (60), se evaluó la concentración y pureza del ADN (61). Posteriormente se aplicó el sistema qPCR-Taqman® para determinar la carga parasitaria de *T. cruzi* en todos los tipos de muestras. En el análisis estadístico se aplicó la prueba t de Student para muestras pareadas, considerando un nivel de significancia (α) de 0,05 y posterior corrección de Bonferroni, chi cuadrado secuencial (χ^2) y coeficiente de correlación de Spearman (r_s).

4.2 Criterios de inclusión

Para la población en estudio se consideró: a) Personas adultas que posean dos resultados serológicos concordantes (ambos positivos) para la infección por *T. cruzi*, realizados mediante dos técnicas serológicas convencionales diferentes (ELISA e IFI IgG) y confirmadas por el ISP; b) Individuos provenientes de la misma zona geográfica (Región de Coquimbo); c) Aceptar y firmar el Consentimiento Informado para el uso de muestras biológicas correspondiente al año de obtención de la muestra.

4.3 Consideraciones Éticas y Consentimiento Informado

Los individuos seleccionados firmaron el Consentimiento Informado, previamente aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (011-2017) (**Anexo 1**) y el Comité de Ética Norte del Servicio de Salud Coquimbo (**Anexo 2**).

4.4 Población en estudio

La población en estudio corresponde a 53 personas confirmadas serológicamente, mediante técnicas de ELISA e IFI IgG para ECh crónica (17,33) y sin tratamiento farmacológico, procedentes de diferentes sectores rurales de la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo. Se realizó la determinación serológica de anticuerpos IgG contra el parásito, mediante técnica de ELISA IgG, y las muestras que resultaron positivas o indeterminadas fueron enviadas a confirmación por el Instituto de Salud Pública de Chile, Sección Parasitología, según establece la normativa vigente en el país (17, 20, 23).

4.5 Caracterización epidemiológica de la población en estudio

De las 53 personas confirmadas serológicamente y sin tratamiento para ECh, 35 son mujeres y 18 hombres. El 100% procede de áreas rurales de la comuna de Combarbalá. Los promedios de edad, peso y estatura fueron de 65,7 años al inicio del estudio, 68,2 kg y 1,55 m, respectivamente. No se presentaron co-morbilidades en 18 personas (34%), mientras que las demás, presentaron co-morbilidades tales como: hipertensión arterial (49%), hipercolesterolemia (20,7%), hipotiroidismo (9,4%), pre-diabetes (9,4%), diabetes mellitus (5,6%), dislipidemia (3,8%), silicosis (1,8%) y enfermedad pulmonar bronco-obstructiva (EPBO) (1,8%). Estas fueron registradas por el clínico del proyecto (Dr. Werner Apt, parasitólogo). La condición electrocardiográfica fue determinada por cardiólogo especialista (Dr. Marcelo Llancaqueo, Hospital Clínico Universidad de Chile) y fue clasificada como normal, leve o severa. Los pacientes con condición normal fueron 26 (49%), condición leve 14 (26%) y 13 con condición severa (25%). En el **Anexo 3** se detalla la caracterización epidemiológica de la población en estudio.

4.6 Obtención y procesamiento de las muestras biológicas

A partir de una punción venosa, se obtuvieron 10 ml de sangre periférica de cada uno de los pacientes, los cuáles fueron distribuidos en tres tipos de tubos, como se detalla a continuación: 4 mL en tubo sin aditivos (para obtención de suero y realización de pruebas serológicas), 3 mL en tubo con anticoagulante EDTA (para obtención de capa leucocitaria y realización de pruebas moleculares) y 3 mL en tubo con GE en proporción 1:1 (para pruebas moleculares). Se separó la capa leucocitaria de las muestras obtenidas en EDTA centrifugando a 3.500 rpm por 15 minutos, antes de 72 hrs desde su obtención. Estas fueron almacenadas a -80°C hasta la extracción de ADN (59). Una vez realizadas las pruebas serológicas, la sangre total obtenida en GE de los pacientes serológicamente positivos para ECh, fueron separadas en dos alícuotas de 2 mL cada una, donde una alícuota fue hervida a 98°C por 15 minutos (13, 45), mientras que la otra se mantuvo sin hervir, almacenando ambas a 4°C hasta la extracción de ADN (13). Las muestras fueron clasificadas en grupos de estudio como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de muestras en grupos de estudio.

Tamaño muestral y procedencia	Metodología de obtención y procesamiento	Clasificación del grupo de estudio
53 muestras de sangre periférica de pacientes con ECh crónica no tratados	Sangre total en GE hervida a 98°C por 15 minutos (GEH)	Grupo Control
	Sangre total en GE no hervida (GENH)	Grupo I
	Capa leucocitaria en EDTA (CL)	Grupo II

4.7 Extracción de ADN

Todas las muestras (Grupo I, II y control) fueron extraídas a partir de un volumen de 250 µL, utilizando el Kit E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit Omega Bio-tek, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (59). Todas las muestras de ADN se almacenaron a -20°C, hasta la determinación de su concentración y pureza, mediante espectrofotometría.

4.8 Determinación de concentración y pureza del ADN extraído

La concentración y pureza de los ADN de los tres tipos de muestras (Grupo I, II y control) fue determinada utilizando el equipo NanoDrop (Denovix DS-11FX Series Spectrophotometer), que mide concentración de ADN e índice de pureza a absorbancias 260/280 nm y 260/230 nm (60,61,62), siguiendo las recomendaciones del fabricante. El procedimiento fue realizado en dependencias del Laboratorio de Carcinogénesis Química y Farmacogenética (CQF), de la Facultad de Medicina Occidente, Universidad de Chile.

La clasificación en rangos de pureza según las razones de longitud de onda, se observan en las **Tablas 2 y 3**. Según la bibliografía utilizada, estas relaciones sólo tendrían validez con concentraciones altas de ADN (aprox >50 ng/uL) (61).

Tabla 2. Índices de pureza del ADN a 260/280 nm

Índice de pureza A260/280	Pureza de ADN
$\geq 1,8-2,1$	ADN de pureza óptima
$\geq 1,6-1,7$	ADN de pureza aceptable
$< 1,6$	ADN contaminado con compuestos aromáticos (proteínas)
$> 2,1$	ADN contaminado con ARN

Tabla 3. Índices de pureza del ADN a 260/230 nm

Índice de pureza A260/230	Pureza de ADN
$> 2-2,2$	ADN de pureza óptima
$> 1,8$	ADN de pureza aceptable
$< 1,8$	ADN contaminado con sales caotrópicas, fenol, hidratos de carbono
$< 1,5$	ADN altamente contaminado con sales caotrópicas, fenol, hidratos de carbono (puede afectar funcionalidad)

4.9 Cepas de *T. cruzi* y elaboración de curva estándar

Para la cuantificación de ADN de *T. cruzi* en muestras clínicas, se preparó una curva estándar a partir de la extracción de ADN de epimastigotes de clones pertenecientes a las cepas Dm28c (TcI) e Y (TcII), correspondientes a los DTU que circulan con mayor frecuencia en Chile (47,63,64). Estas fueron obtenidas de cultivos axénicos provistos por el Dr. Gonzalo Cabrera y

la Dra. Lucía Valenzuela (Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). La mezcla de ambas cepas de parásitos fue realizada en relación 1:1 en un tubo, conteniendo 1×10^6 epimastigotes, considerando que cada célula parasitaria posee aproximadamente 200 fg de ADN; es decir, 1.000.000 de parásitos-eq/mL corresponde a una concentración de 0,2 ng/ μ L de ADN (3,42,62,64,65). Para esto, se tomaron volúmenes correspondientes de ADN de cada cepa, diluidos en buffer de elución del kit de extracción, preparando soluciones con una concentración de 0,4 ng/ μ L de ADN. Para confirmar que se contaba con el valor requerido, la concentración de esta mezcla fue cuantificada en espectrofotómetro Qubit® ds DNA HS Assay Kit en el fluorómetro Qubit® 3 (ThermoFisher, USA) (66), disponible en la Facultad de Medicina Veterinaria y Pecuaria, Universidad de Chile. La mezcla fue posteriormente diluida para alcanzar una concentración de 0,2 ng/ μ L de ADN, obteniéndose así el tubo madre con el cual se prepararon los distintos puntos de la curva de calibración. A partir del tubo con 1×10^6 parásitos, se prepararon diluciones seriadas en el orden de 10 (100.000, 10.000, 1.000, 100, 10, 1 y 0.1 par/mL), utilizando como diluyente, un pool de ADN negativo proveniente de individuos sanos, sin ECh (16,51,62,64) de los tres tipos de muestra (CL, GEH y GENH). Se construyó una curva estándar por cada metodología utilizada (Grupos I, II y control). Cada punto de la curva se evaluó en duplicado en cada ensayo de qPCR. En cada uno de los ensayos, dos controles cuantitativos fueron incorporados como muestras problema.

Para evaluar que el desempeño de la curva estándar permite validar la corrida analítica, se verificó que los parámetros de eficiencia de la reacción (Eff), linealidad (coeficiente de correlación lineal R^2) y pendiente (Y), cumplan con los criterios de aceptación preestablecidos en la literatura (56, 67), señalados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Criterios de aceptación según parámetros evaluados en una curva estándar que permiten validar una corrida analítica mediante sistema de qPCR.

Parámetro	Criterio de aceptación
Eficiencia (Eff)	[90 - 110] %
Linealidad (R^2)	> 0,98
Pendiente (Y)	[-3.1 a -3.6]

4.10 Cuantificación de *T. cruzi* mediante sistema qPCR-TaqMan®

La carga parasitaria en las muestras de estudio (CL, GEH y GENH) se cuantificó mediante ensayos de qPCR con el sistema de detección con sondas TaqMan®, en termociclador Mx3000P™ Stratagene (Agilent Technologies), utilizando los cebadores satADN Cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3'), Cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') y Cruzi 3 (FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MFB) (32,50). El volumen de reacción final fue de 20 µL. Para la preincubación se realizó 1 ciclo a temperaturas de 25°C por 1 s y 95°C por 10 minutos. Las etapas de denaturación, hibridación y extensión, constaron de 40 ciclos a 95°C por 15 s y 58°C por 1 minuto. El detalle de los volúmenes del mix de reacción y las temperaturas utilizadas en los ciclos de amplificación se detallan en la **Tabla 5** y **Figura 1**, respectivamente (50,58). En esta reacción, se co-amplificó la secuencia objetivo (satDNA) y los reactivos de control positivo interno exógeno (Exo-IPC) (Applied Biosystems) TaqMan® optimizados previamente (68). Como controles negativos se utilizó agua libre de nucleasas y pool de ADN humano de sangre periférica de individuos con serología negativa para ECh, de los tres tipos de muestra. Las DTU de referencia TcI (Dm28c) y TcII (Y) se usaron como controles positivos. Cada ensayo incluyó en duplicado: curva estándar, controles negativos, controles positivos y controles de cargas parasitarias de *T. cruzi* incorporados como muestras problema, los cuáles correspondían a puntos de la curva (más bajo y más alto), pero evaluados como muestras problemas.

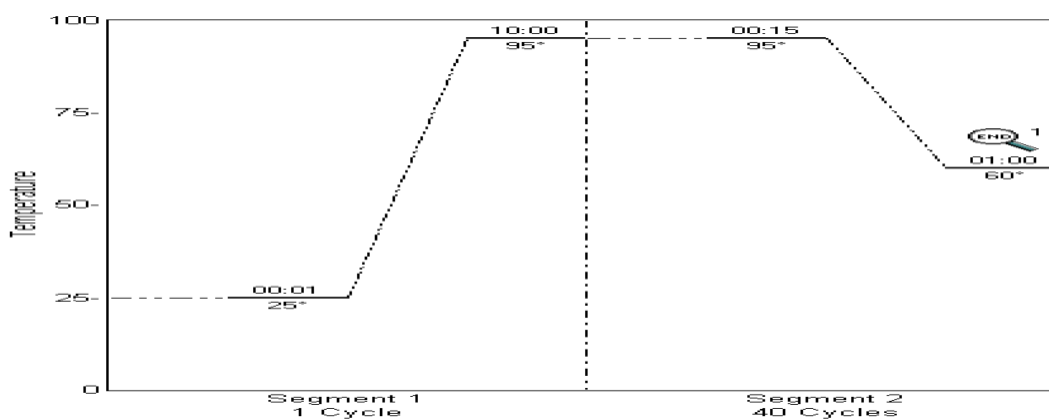
La qPCR posee un límite de detección de 0,1 y 0,01 par-eq/mL (65). Sin embargo, las parasitemias menores a 0,1 par-eq/mL, es decir, que se encuentran bajo el último punto de la curva estándar incorporada en el estudio, a nuestro criterio, se consideran resultados positivos no cuantificables, por lo que resultados inferiores corresponderían a trazas de ADN.

Tabla 5. Volúmenes de reactivos utilizados en el Mix de reacción de qPCR-Taqman®

Reactivo	Volumen	Concentración
Cruzi 1 (primer)	0,3 µL	0,75 µM
Cruzi 2 (primer)	0,3 µL	0,75 µM
Cruzi 3 (sonda)	0,1 µL	0,05 µM
Brilliant Multiplex QPCR Master Mix	10 µL	1X

Reference Dye ROX	0,3 μL	0,03 μM
Exo IPC Mix	2 μL	1X
Exo IPC DNA	0,4 μL	1X
Albúmina sérica bovina	0,04 μL	0,1 μM
Agua libre de nucleasas	1,56 μL	-
ADN templado	5 μL	-
Volumen total	20 μL	-

Figura 1. Perfil térmico usado en el ensayo de qPCR-Taqman®



4.11 Análisis estadístico

Se consideraron como variables cuantitativas los resultados de concentración ($\text{ng}/\mu\text{l}$) y carga parasitaria ($\text{par-eq}/\text{ml}$), mientras que las variables cualitativas correspondieron a los resultados de pureza del ADN, establecido en rangos. Se estableció un nivel de significancia $\alpha=0,05$.

Se utilizó prueba t de Student para muestras dependientes y corrección de Bonferroni ($\alpha=0,016$) para comparación de concentración de ADN y cargas parasitarias de cada uno de los tipos de muestra. Se utilizó la prueba de Chi cuadrado secuencial (χ^2) para comparar las purzas del ADN de los tres tipos de muestras y la cantidad de muestras con ADN detectable en cada uno de los grupos. Para establecer la asociación entre la concentración de ADN y la carga parasitaria se utilizó la prueba de correlación de Spearman (r_s) para variables no paramétricas. Los detalles de las pruebas estadísticas se encuentran en el **Anexo 4**.

4.12 Equipos utilizados

- Nanodrop Denovix DS-11FX Series Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., EE.UU)
- Mx 3000 P Stratagene (Agilent Technologies, Santa Clara, California-USA)
- Qubit® 3 (ThermoFisher, USA)
- Cabina de extracción (AirClean Systems 600 PCR Workstation)
- Campana de Flujo Laminar (Streamline Laboratory products, Singapore)
- Centrífuga M-24A (Boeco, Germany)
- Centrífuga HERMLE Z 206-A (Wehingen, Germany)

5. RESULTADOS

5.1 Concentración de ADN según tipos de muestra

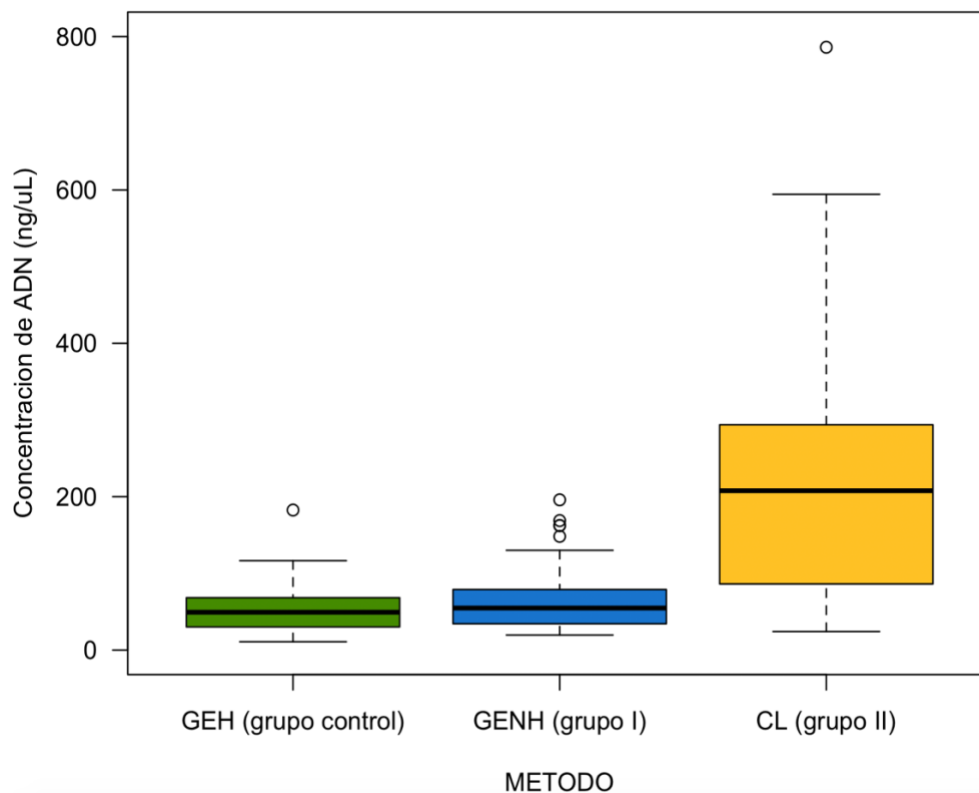
En la **Tabla 6** se detallan las concentraciones de ADN obtenidas en las muestras en GEH (Grupo I), las que fluctuaron entre 10,758 ng/ μ L y 182,530 ng/ μ L, mientras que las concentraciones de ADN de las muestras en GENH (Grupo I) fluctuaron entre 19,534 ng/ μ L y 195,868 ng/ μ L. Las concentraciones de ADN en muestras de CL (Grupo II) alcanzaron concentraciones entre 24,11 ng/ μ L y 786,07 ng/ μ L. El promedio de las concentraciones de ADN, en orden decreciente fueron: CL, GENH y GEH (**ver Figura 2**). Con el análisis de prueba T, considerando valor $p < 0,05$ y corrección de Bonferroni ($\alpha=0,016$), se establece que existe mayor concentración de ADN en las muestras obtenidas desde la CL, con diferencia significativa en comparación con las muestras provenientes de GEH ($p < 0,001$, $t = -7.51$) y GENH ($p < 0,01$, $t = -6.59$). No existe diferencia significativa entre las concentraciones de las muestras de GEH y GENH ($p=0,044$, $t = -2.06$).

Tabla 6. Promedio, mediana y desviación estándar (DS) de las concentraciones de ADN (ng/ μ L) de muestras en GEH, GENH y CL, determinadas mediante espectrofotometría.

	Concentración de ADN (ng/ μ L)		
	GEH (grupo control)	GENH (grupo I)	CL (grupo II)
Promedio	51,5	65,6	221,8
Mediana	49,3	54,8	207,7
Desviación estándar (DS)	$\pm 30,5$	$\pm 42,0$	$\pm 160,4$

Los detalles de las mediciones de concentración se encuentran en el **Anexo 5**. Las mediciones de concentración y pureza de las muestras en GEH y GENH, se realizaron en duplicado, debido a que el equipo arrojaba en ocasiones alertas de bajas concentraciones o de los índices de pureza, a diferencia de las mediciones de CL, que fueron determinadas en su mayoría con una sola medición, como indica el manual de usuario.

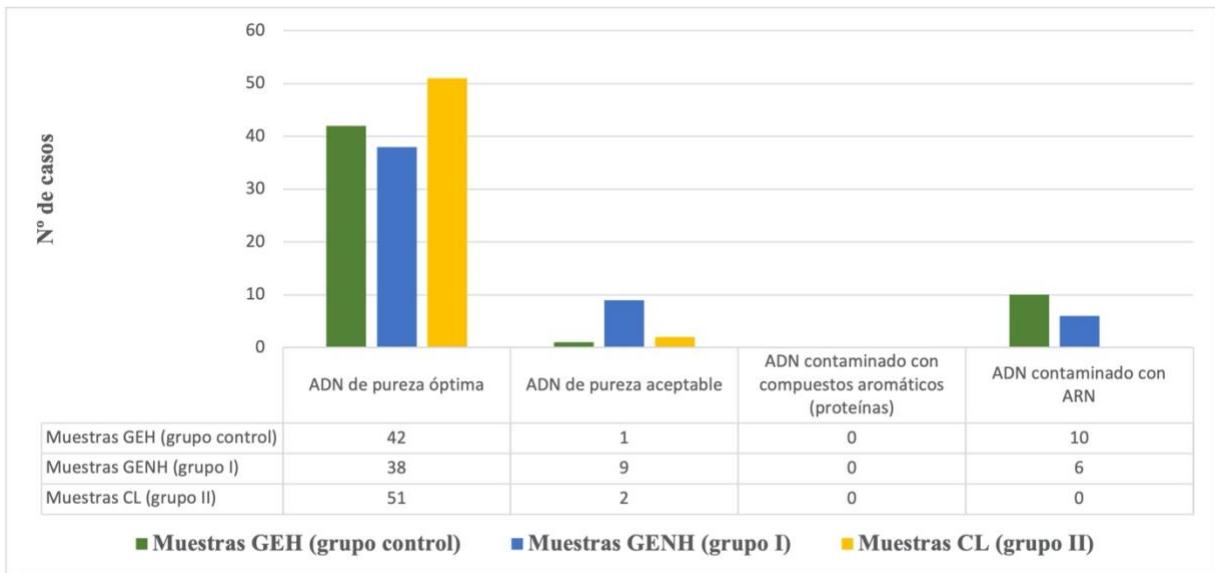
Figura 2. Concentración de ADN (ng/μL) según tipo de muestra



5.2 Índice de pureza de ADN a A260/280 nm y A260/230 nm, según grupos de estudio

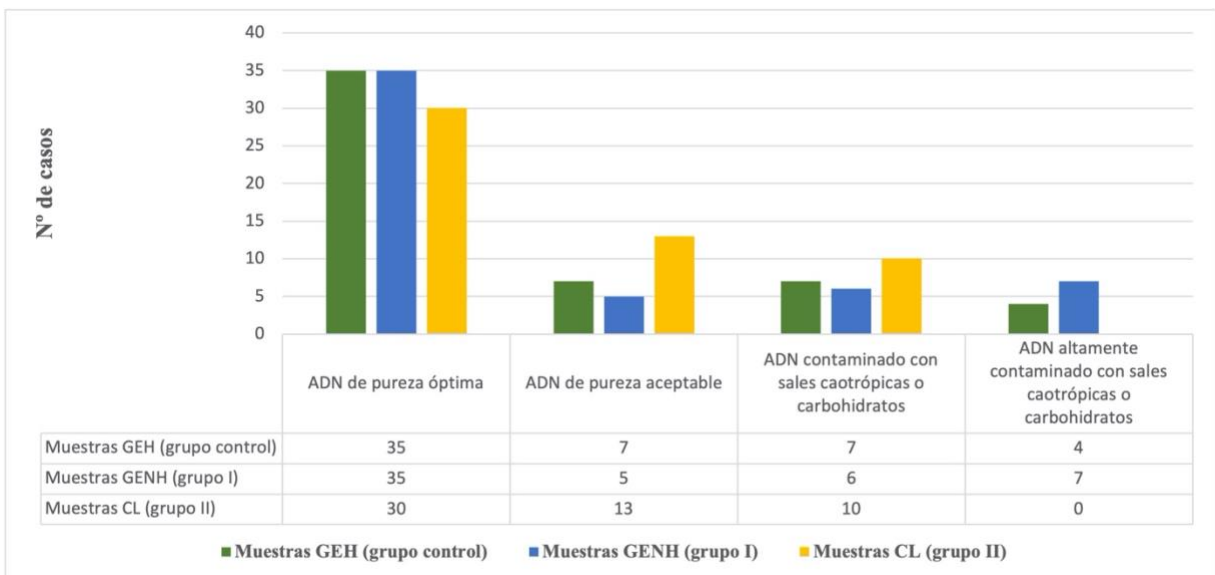
En las **Figuras 3** y **4** se describen los índices de pureza de los ADN obtenidos a 260/280 nm y 260/230 nm, respectivamente. Se establece que existen diferencias significativas en la pureza del ADN entre los tipos de muestras analizadas ($\chi^2=21,03$, $p= 0,0003$), estableciendo que las muestras de CL presentan un ADN más puro que los otros tipos de muestras, sustentado en que no presentan evidencias de contaminación. Al comparar las muestras de GEH y GENH, se establece que existen diferencias ($p= 0,022$), considerando que las muestras en GENH presentan menor número de muestras contaminadas y suman mayor número de muestras dentro de los rangos óptimos y aceptables de pureza. En el **Anexo 6** se detallan los resultados obtenidos de acuerdo a la pureza de las muestras.

Figura 3. Pureza del ADN a 260/280 nm, según tipo muestras



Los índices de pureza obtenidos a 260/230 nm, observados en la **Figura 4** no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio ($\chi^2 = 0,168, p = 0,051$).

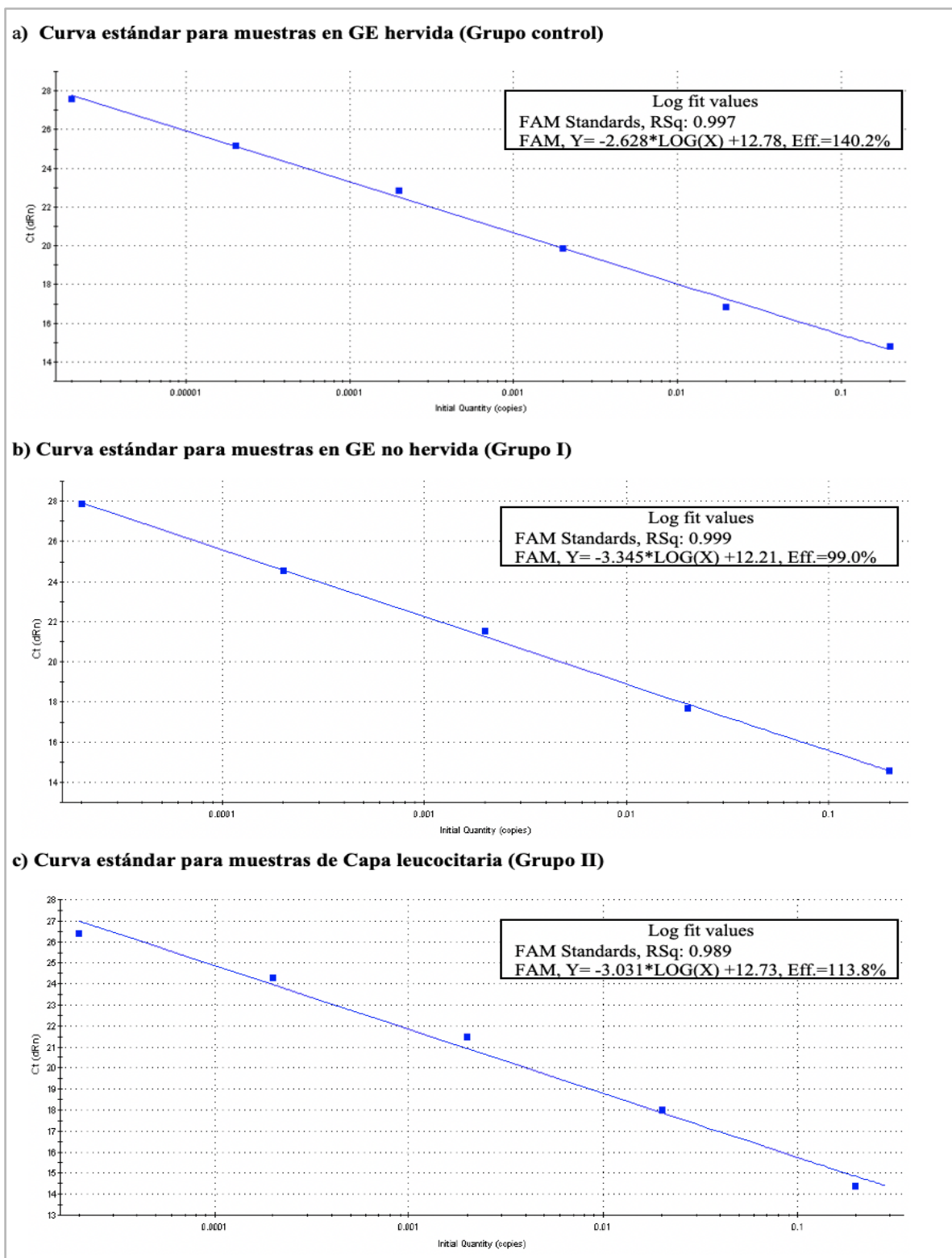
Figura 4. Pureza del ADN a 260/230 nm, según tipo de muestra



5.3 Curvas de calibración de *Trypanosoma cruzi* utilizadas en qPCR-Taqman®

Para cada grupo de muestras se realizaron ensayos de qPCR individuales, incorporando las curvas estándar preparadas en duplicado, como fue descrito anteriormente. Los ensayos fueron aceptados cuando las curvas cumplieron con requisitos descritos en la **Tabla 4**. En la **Figura 5** se observan las curvas de calibración obtenidas, según grupos de estudio.

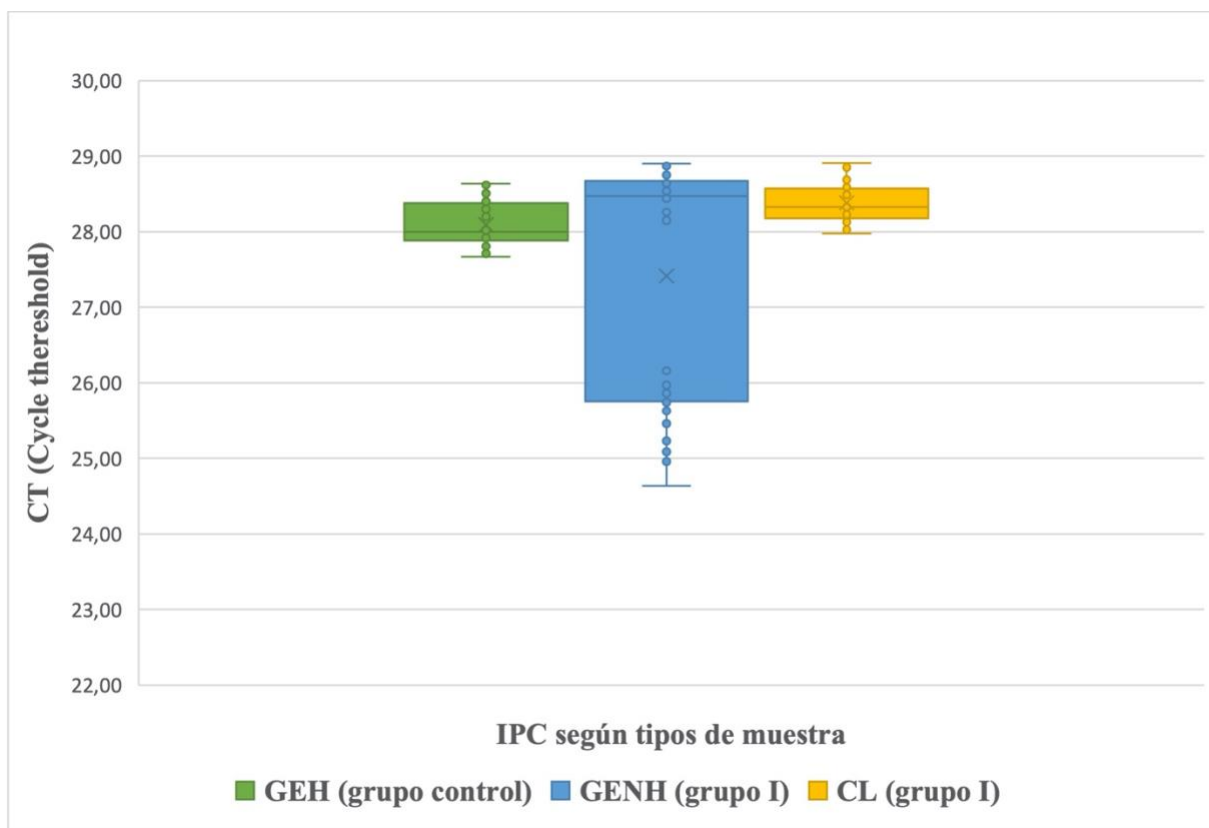
Figura 5. Curvas de calibración de *Trypanosoma cruzi*, según grupos de estudio.



5.4 Control de reacción IPC (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Applied Biosystems)

En el 100% de las muestras en estudio, se observó amplificación del control IPC (resultados positivos), cuyos Ct (Cycle threshold) o umbral de ciclos, presentaron valores menores a 30, los cuáles se describen detalladamente en el **Anexo 7**, lo que permitió validar y determinar que en la reacción de qPCR no hubo inhibición ni falsos negativos por ausencia de ADN. En la **Figura 6** se observan los valores de los Ct para el IPC, según el tipo de muestra analizada mediante qPCR-Taqman®.

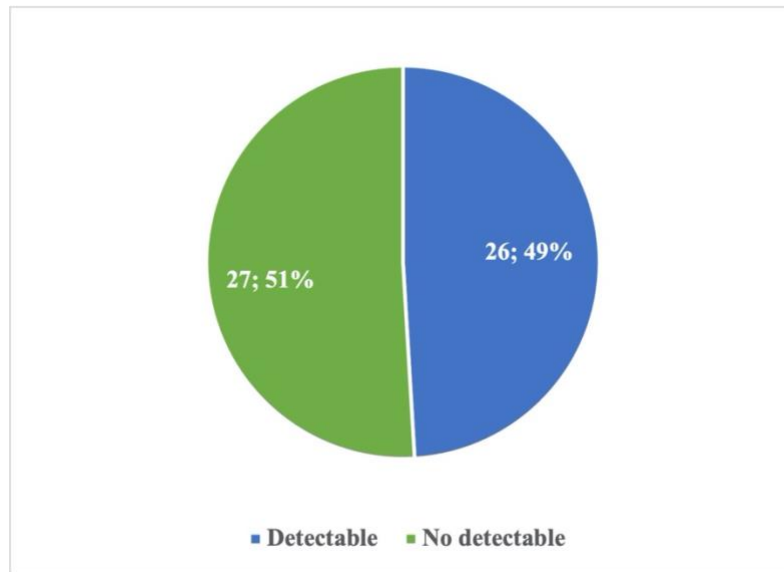
Figura 6. Distribución de los CT para el IPC Taqman®, según tipo de muestra



5.5 Detección de *T. cruzi* mediante qPCR-Taqman® en los grupos de estudio

En la **Figura 7** se muestran los resultados de la detección de *T. cruzi* utilizando el sistema de qPCR-Taqman®, en los 53 pacientes estudiados. En 26 casos (49%) se logró detectar presencia de ADN de *T. cruzi*, en alguno de los tres tipos de muestras analizadas (GEH, GENH y CL), mientras que en 27 casos (51%), no se detectó ADN del parásito en ninguno de los grupos.

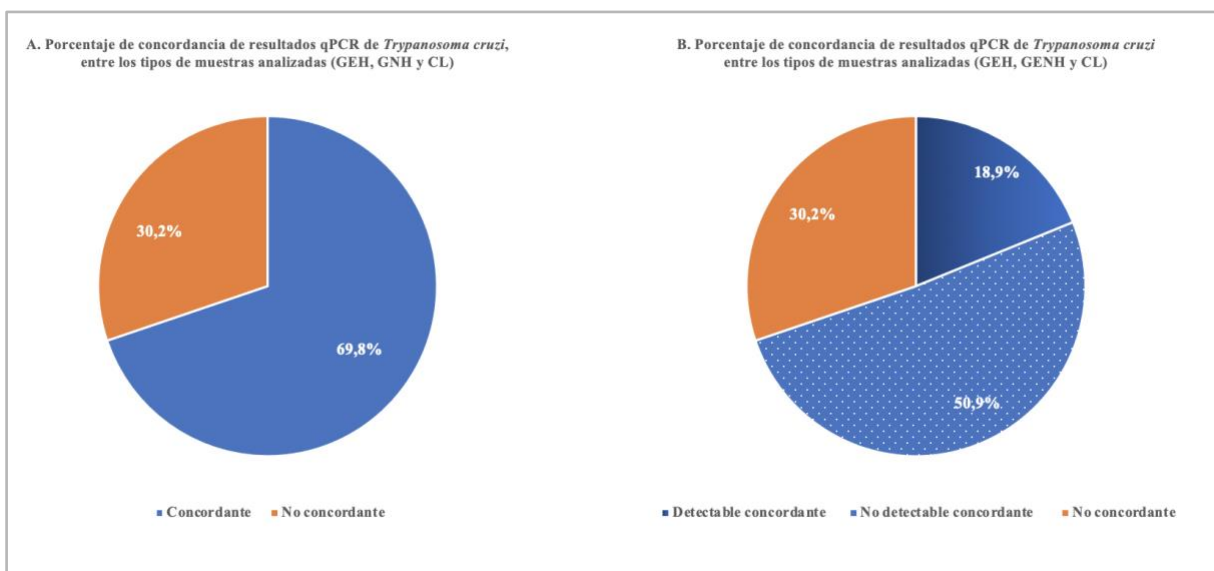
Figura 7. Resultados de detección de ADN de *T.cruzi* mediante qPCR-Taqman ® en la población en estudio



5.6 Concordancia de resultados qPCR-Taqman® para *Trypanosoma cruzi* entre los distintos tipos de muestras

En 37 pacientes (69,8%) hubo concordancia entre los resultados de qPCR obtenidos entre las muestras de GEH, GENH y CL, ya sea detectable o no detectable. En 10 de ellos (18,9%) se detectó ADN parasitario tanto en GEH, GENH y CL, mientras que en 27 casos (51%) no se detectó el parásito en sangre de ninguno de los tres tipos de muestras. Por tanto, en los 16 pacientes (30,2%) restantes, existieron tanto resultados detectables y no detectables de *T. cruzi* dependiendo del tipo de muestra (**Figura 8**).

Figura 8. Concordancia de resultados de qPCR entre tipos de muestra



5.7 Detección de ADN de *T. cruzi*, mediante qPCR-Taqman® en los distintos tipos de muestras

En el total de pacientes estudiados (n=53), se logró pesquisar ADN de *T. cruzi* en un total de 26 pacientes al analizar una, dos o los tres tipos de muestras, como se detalla en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cuantificación de *T. cruzi* mediante qPCR-Taqman® en los distintos tipos de muestras.

Nº	ID	GEH (grupo control) (par-eq/mL)	GENH (grupo I) (par-eq/mL)	CL (grupo II) (par-eq/mL)
1	5303	0,62	1,18	18,43
2	5385	0,05	no detectable	no detectable
3	5392	no detectable	0,76	0,80
4	5397	0,09	no detectable	no detectable
5	5410	0,11	no detectable	1,37
6	5413	no detectable	2,37	no detectable

7	5421	1,15	7,55	9,00
8	5427	0,08	3,93	no detectable
9	5472	0,08	no detectable	0,64
10	5489	0,06	no detectable	no detectable
11	5509	0,15	2,59	1,19
12	5515	0,08	0,39	0,86
13	5531	0,09	2,72	no detectable
14	5536	0,42	4,72	2,09
15	5541	1,29	3,49	12,17
16	5544	no detectable	no detectable	0,09
17	5558	no detectable	no detectable	0,08
18	5569	no detectable	0,83	0,38
19	5588	0,25	0,65	0,43
20	5590	0,21	2,36	0,94
21	5602	no detectable	0,52	0,20
22	5603	0,04	no detectable	no detectable
23	5611	0,08	0,37	3,40
24	5612	0,06	0,51	no detectable
25	5632	0,25	0,91	0,03
26	5658	no detectable	no detectable	0,04

En 10 pacientes (38,4%) se detectó simultáneamente la presencia del parásito en todos los tipos de muestras (GEH, GENH y CL). Al analizar dos tipos de muestra (GEH-GENH, GEH-CL o GENH-CL) se detectaron 8 casos positivos (30,8%), lo mismo que si se hubiese analizado un solo tipo de muestra (GEH, GENH o CL), es decir, 8 casos (30,8%). Ver distribución de combinaciones en **Tabla 8**.

Tabla 8. Distribución de los casos donde se detectó ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante qPCR-Taqman®, en los distintos tipos de muestra de estudio

Nº de casos	GEH (grupo control)	GENH (grupo I)	CL (grupo II)	%
10	+	+	+	18,86
3	+	+	-	5,66
2	+	-	+	3,77
3	-	+	+	5,66
4	+	-	-	7,54
1	-	+	-	1,88
3	-	-	+	5,66
n= 26	19 (35,8%)	17 (32%)	18 (34%)	49%

Por lo tanto, se determinó la presencia de ADN de *T. cruzi* en 19 muestras de GEH (35,8%), 17 de GENH (32%) y 18 de CL (34%), respectivamente. Se establece que no existen diferencias significativas entre la cantidad de muestras positivas por grupo de estudio ($\chi^2= 0,168$, $p=0,92$). De estos 26 individuos con cargas parasitarias detectables en muestras sanguíneas, 15 de ellos (57,6%) tienen sobre 60 años y otros 13 (50%) presentan daño cardíaco de leve a severo. 16 personas (61,5 %) presentan co-morbilidades (**Anexo 8**).

5.8 Cuantificación de la carga parasitaria (par-eq/mL) de *T. cruzi* según tipos de muestra de estudio, mediante qPCR-Taqman®

Cada uno de los grupos de muestras, presentó diferentes valores de parasitemias, ubicándose en los rangos mostrados en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Rangos de parasitemia detectables según tipo de muestra

Rango (par-eq/ml)	N° de muestras GEH (grupo control)	N° de muestras GENH (grupo I)	N° de muestras CL (grupo II)	Total muestras	%
≥ 10-100	0	0	2	2	3,7 %
≥ 1- 9	2	9	5	16	29,6 %
≥ 0,1- 0,99	7	8	7	22	40,7 %
≥ 0,01- 0,09	10	0	4	14	26 %
Total	19	17	18	54	100

En la **Tabla 10**, se observan los intervalos entre los cuáles fluctuaron las parasitemias de cada uno de los grupos de estudio, así como promedios y desviación estándar (DS), considerando la cantidad de muestras positivas por cada grupo.

Tabla 10. Carga parasitaria global de *T. cruzi*, según la cantidad de muestras positivas por grupo de estudio

	GEH (grupo control) n=19	GENH (grupo I) n=17	CL (grupo II) n=18
Intervalos	0,04 – 1,29 par-eq/mL	0,37 – 7,55 par-eq/mL	0,03-18,43 par-eq/mL
Promedio	0,27 par-eq/mL	2,11 par-eq/mL	2,90 par-eq/mL
DS	± 0,37	± 1,96	± 5,1

Por otro lado, considerando los límites de cuantificación de parasitemia establecidos en el laboratorio, se pudo cuantificar parasitemia de forma confiable (descartando los valores inferiores a 0,1 par-eq/mL), en 9 casos en GEH, 17 casos en GENH y 14 casos en CL, como se muestra en la **Tabla 11**. Se estableció que no hay diferencias significativas en la cantidad de muestras cuantificables por grupo de estudio ($\chi^2=3,27$, $p= 0,19$).

Tabla 11. Cargas parasitarias cuantificables ($\geq 0,1$ par-eq/mL) según tipo de muestra

	GEH (grupo control) n=9	GENH (grupo I) n=17	CL (grupo II) n=14
Intervalos	0,11 – 1,29 par-eq/mL	0,37 – 7,55 par-eq/mL	0,20 – 18,43 par-eq/mL
Promedio	0,49 par-eq/mL	2,11 par-eq/mL	3,71 par-eq/mL
DS	$\pm 0,44$	$\pm 1,96$	$\pm 5,54$

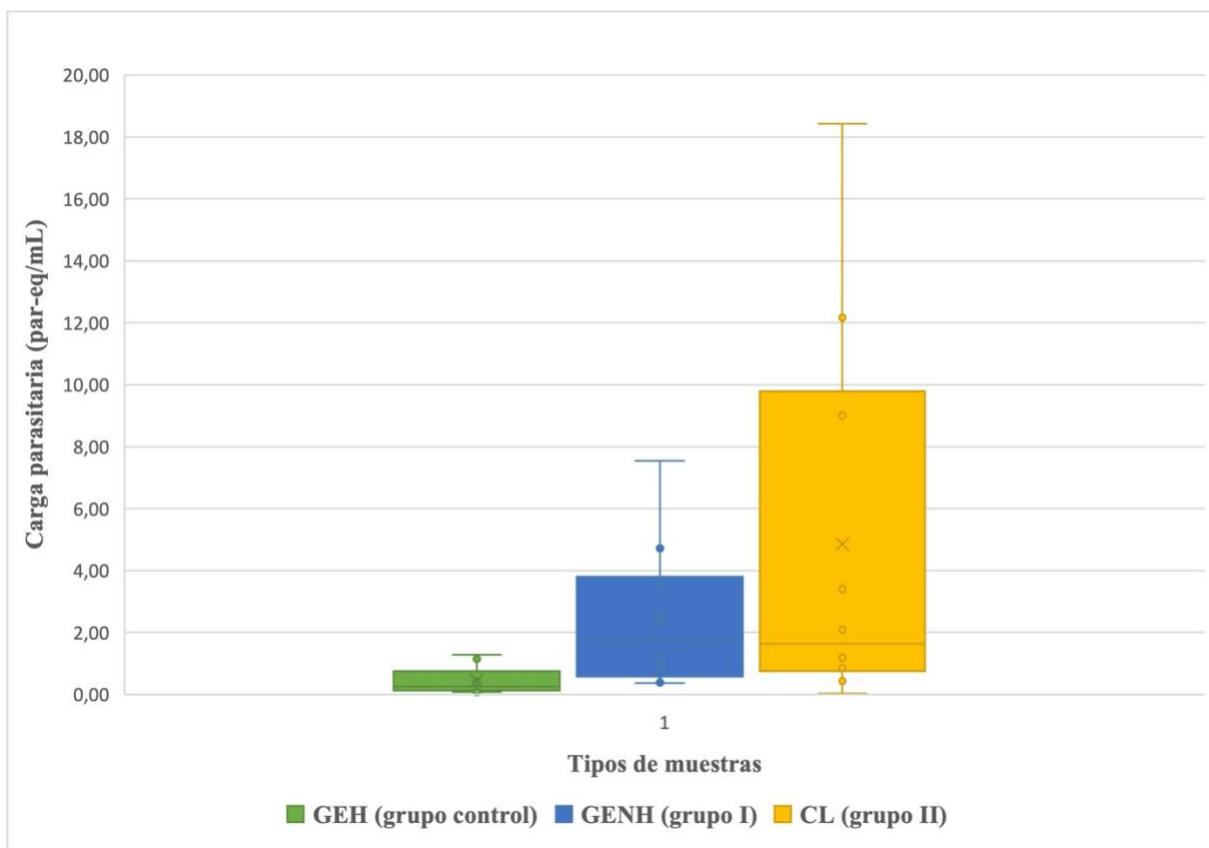
5.9 Positividad y carga parasitaria (par-eq/mL) de *T. cruzi* al analizar simultáneamente los tres tipos de muestras en estudio.

Como se mencionó anteriormente, en 10 pacientes fue posible detectar simultáneamente *T. cruzi* en todas sus muestras (GEH, GENH y CL). Ver intervalos, promedios y DS de parasitemias en **Tabla 12** y **Figura 9**. Solamente se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las cargas obtenidas en GEH y GENH ($t=-3,069$, $p= 0,013$), siendo mayores en muestras de GENH. No se encontraron diferencias significativas entre las cargas obtenidas en GEH y CL ($t=-2,33$, $p=0.044$), y GENH y CL ($t=-1,25$, $p=0,24$). Ver **Anexo 9** para detalle de las parasitemias.

Tabla 12. Carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* en 10 pacientes con ECh crónica, detectada simultáneamente en los tres tipos de muestras.

	GEH (grupo control) n=10	GENH (grupo I) n=10	CL (grupo II) n=10
Intervalo	0,08 – 1,29 par-eq/mL	0,37 – 7,55 par-eq/mL	0,03 – 18,43 par-eq/mL
Promedio	0,45 par-eq/mL	2,42 par-eq/mL	4,85 par-eq/mL
DS	$\pm 0,44$	$\pm 2,31$	$\pm 6,26$

Figura 9. Intervalos de carga parasitaria (par-eq/mL) de *T.cruzi*, en 10 pacientes con ECh crónica determinada simultáneamente en 3 tipos de muestras, mediante qPCR



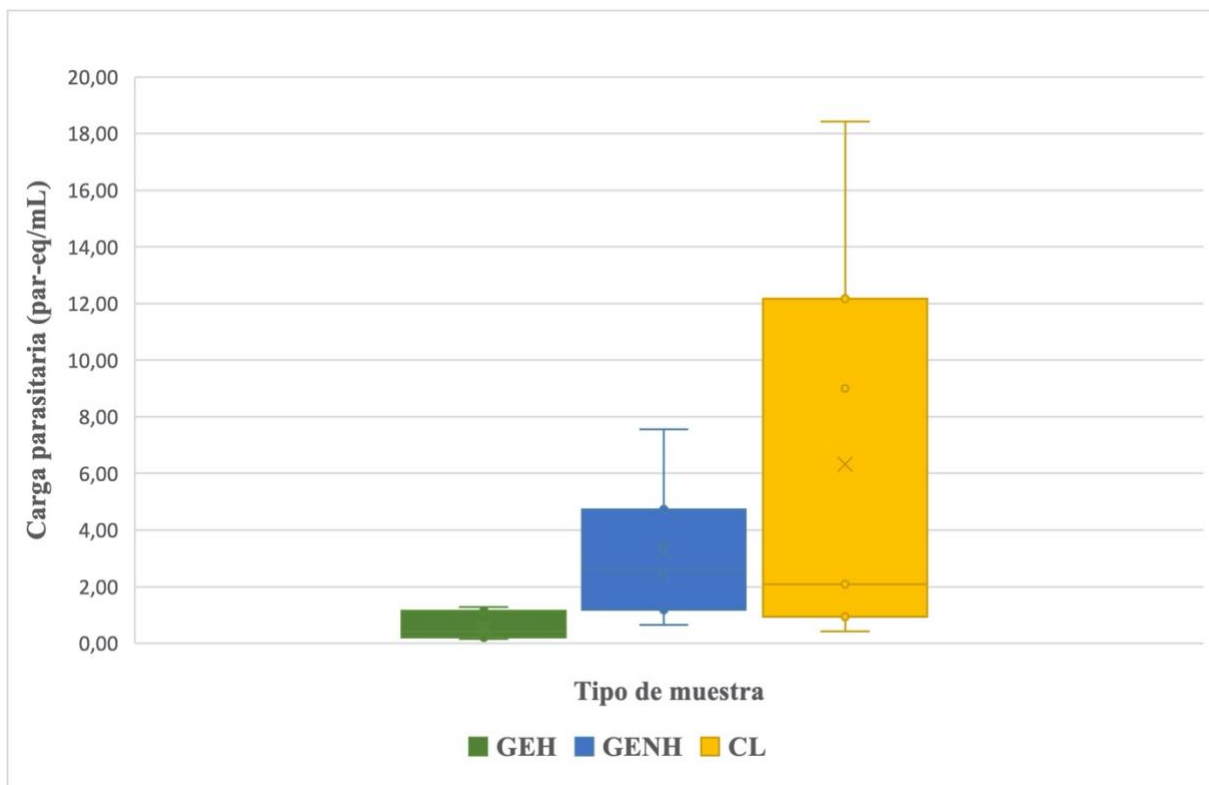
Ahora bien, considerando los resultados positivos cuantificables ($\geq 0,1$ par-eq/mL), sólo en 7 pacientes se podría entregar el valor de la parasitemia obtenida al analizar simultáneamente los tres tipos de muestras (Tabla 13 y Figura 10).

Tabla 13. Carga parasitaria cuantificable ($\geq 0,1$ par-eq/mL) de 7 pacientes detectados simultáneamente en los tres tipos de muestras.

	GEH (grupo control) n=7	GENH (grupo I) n=7	CL (grupo II) n=7
Intervalo	0,15 – 1,29 par-eq/mL	0,65 – 7,55 par-eq/mL	0,43 – 18,43 par-eq/mL
Promedio	0,58 par-eq/mL	3,22 par-eq/mL	6,32 par-eq/mL
DS	± 0,46	± 2,34	± 7,02

No se encontraron diferencias significativas entre las parasitemias obtenidas en los distintos tipos de muestras ($p= 0,016$): GEH vs GENH ($p=0,016$), GEH vs CL ($p=0,06$), GENH vs CL ($p=0,303$).

Figura 10. Carga parasitaria (par-eq/mL) de *T.cruzi*, en 7 casos detectados simultáneamente en los tres tipos de muestras, mediante qPCR-Taqman ®



5.10 Asociación de la concentración de ADN total con la carga parasitaria obtenida

Se realizó análisis estadístico de correlación de Spearman (r_s), para el total de pacientes positivos por qPCR en cada uno de los tipos de muestras, estableciendo que no existe correlación entre la concentración de ADN y la carga parasitaria de las muestras en GEH ($r_s = -0,03$), mientras que para las muestras en GENH, estas variables presentaron una correlación negativa muy baja ($r_s = -0,23$). Para las muestras de CL la correlación fue positiva pero también muy baja ($r_s = 0,2$). Sin embargo, al analizar solamente los casos donde se obtuvo parasitemia cuantificable ($\geq 0,1$ par-eq/mL), los r_s correspondieron a: 0,46 (GEH), 0,57 (GENH) y 0,96 (CL), indicando una cierta correlación positiva en GEH y GENH, a diferencia de las muestras de CL, donde se observó una mayor correlación positiva, es decir, a medida que aumenta la concentración de ADN, aumentaría la carga parasitaria.

En la **Tabla 14** se muestran las concentraciones, pureza y carga parasitaria de los 10 pacientes en los que se detectó ADN de *T. cruzi* circulante, donde se puede observar que se consiguió un ADN de pureza entre óptima y aceptable en 8 muestras en GEH, 7 muestras en GENH y en 10

muestras (todas) de CL, mientras que 2 muestras de GEH y 3 de GENH presentaron ciertos contaminantes, pero no en cantidades elevadas como para afectar su funcionalidad. Además, no se presentaron diferencias significativas entre las purezas obtenidas por cada grupo de muestras ($p= 0,17$).

Tabla 14. Concentración, pureza y parasitemia de los 10 casos positivos determinados en todos los tipos de muestra

Nº	ID	Concentración de ADN (ng/ul)			Pureza del ADN			Parasitemia (par-eq/mL)		
		GEH	GENH	CL	GEH	GENH	CL	GEH	GENH	CL
1	5303	66,6	36,3	786,0	Óptima	Contaminado con ARN	Óptima	0,62	1,18	18,43
2	5421	62,9	63,3	289,0	Óptima	Óptima	Óptima	1,15	7,55	9,00
3	5509	34,9	82,5	208,1	Óptima	Óptima	Óptima	0,15	2,59	1,19
*4	5515	10,8	115,1	207,7	Contaminado con ARN y sales caotrópicas, carbohidratos, otros	Óptima	Aceptable	0,08	0,39	0,86
5	5536	42,3	49,1	281,2	Óptima	Contaminado con ARN	Óptima	0,42	4,72	2,09
6	5541	51,8	65,2	524,4	Contaminado con ARN	Óptima	Óptima	1,29	3,49	12,17
7	5588	85,3	32,4	144,4	Óptima	Contaminado con ARN	Óptima	0,25	0,65	0,43
8	5590	20,1	53,9	75,3	Óptima	Óptima	Aceptable	0,21	2,36	0,94
*9	5611	80,4	58,8	323,6	Óptima	Óptima	Óptima	0,08	0,37	3,40
*10	5632	24,0	70,3	77,9	Aceptable	Óptima	Aceptable	0,25	0,91	0,03

*Detectables no cuantificables

6. DISCUSIÓN

A pesar de las mejoras en las herramientas diagnósticas para la detección de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre humana, el aislamiento del parásito desde el torrente sanguíneo en la fase crónica de la ECh continúa siendo un desafío. Existe un interés creciente en el desarrollo de estrategias que permitan una obtención precisa de la carga parasitaria en la sangre de individuos con ECh (45). El presente estudio, consideró relevante estudiar los niveles de concentración de ADN presentes en las muestras de sangre periférica de pacientes con ECh crónica, mediante distintas metodologías de obtención y procesamiento de muestras, así como también estudiar su calidad y pureza, con la finalidad de establecer si estas variantes influyen en la detección de la carga parasitaria. Los protocolos utilizados internacionalmente, han validado el uso de muestras de sangre periférica conservadas en GE, y varios métodos de PCR utilizan muestras en GE donde incorporan un paso de ebullición antes de la extracción de ADN (46,50,55). Esto fue diseñado originalmente para mejorar la sensibilidad de los procedimientos basados en la amplificación de ADN de minicírculos de *T. cruzi*. Así, la GE permite lisar los parásitos presentes, liberando su contenido genético y permitiendo detectar tan solo un parásito en un gran volumen de sangre (69,50,55). La ebullición permite la liberación de ADN del kinetoplasto, que al romperse por efecto del calor (“deconcatenamiento”), mejora el rendimiento de la extracción de ADN sobre todo cuando el proceso no es automatizado, además permite preservar la muestra por más tiempo (69). Sin embargo, algunos investigadores prefieren utilizar muestras en GENH para evitar contaminaciones cruzadas entre muestras, pero las cargas parasitarias obtenidas han resultado ser más bajas en comparación a las muestras en GEH, determinadas mediante qPCR (50). Por otro lado, la fracción de la capa leucocitaria, se ha utilizado principalmente para concentrar *T. cruzi* en estudios microscópicos directos en humanos, como en diagnóstico de casos congénitos (70) o en estudio de hemoparásitos en animales, ya que concentra más ADN parasitario que otro tipo de muestra biológica, estimándose una concentración de al menos 5 veces más ADN que el mismo volumen de sangre (71). Se han obtenido resultados satisfactorios en la detección de *T. cruzi* utilizando este método alternativo a partir de muestras de sangre frescas con EDTA, permitiendo concentrar los parásitos en esta fracción antes de la extracción de ADN, aumentando así la sensibilidad de la qPCR en comparación con las muestras de sangre total en GE (55,72,73). El uso de otros anticoagulantes como la heparina, pueden afectar de forma negativa los resultados analíticos de estudios

moleculares, mientras que la extracción de ADN para secuenciación a partir de muestras colectadas en EDTA como anticoagulante es aceptable (74).

Los resultados de este estudio coinciden con los trabajos mencionados, ya que la concentración de ADN total presente en las muestras provenientes de CL fue significativamente mayor ($p < 0,001$) en comparación a los otros dos tipos de muestras en estudio. Sin embargo, hay que considerar, que esta elevada concentración no sólo está dada por el ADN de tripomastigotes circulantes de *T. cruzi*, sino que también se ve incrementada por el ADN genómico humano contenido en los leucocitos. Un estudio para la optimización de extracción de ADN para tipificación molecular de antígenos leucocitarios humanos, determinó que la sangre total y la CL, tanto frescas como congeladas, rindieron en todos los casos una cantidad óptima de ADN, pero desde CL se recuperó un promedio mayor al que se obtiene de sangre total, con cantidades de ADN oscilantes en un amplio rango a diferencia de las de sangre total, lo cual atribuyen a la variabilidad dada por el factor humano (75), como diferencias en la cantidad de leucocitos de cada individuo, influenciado probablemente por su estado de salud o inmunidad, pacientes con neutropenias cíclicas, adecuada homogenización de la sangre con el anticoagulante al momento de la punción (para evitar formación de coágulos que reduzcan la cantidad de células nucleadas disponibles y resta eficacia a la lisis tanto de eritrocitos como de leucocitos), entre otros (74).

En nuestro estudio, las concentraciones de ADN de CL también fueron muy variables, que oscilaron entre 24,11 ng/ μ L y 786,07 ng/ μ L, con una DS mucho más alta que las muestras de sangre total en GEH y GENH. Las muestras de sangre en GEH y GENH, obtuvieron concentraciones mucho más bajas que en la CL, pese a ser obtenidas de un mismo paciente. Esto puede explicarse porque las muestras de sangre total fueron mezcladas en proporción 1:1 con la GE, lo cual genera dilución de la muestra a la mitad, disminuyendo así la concentración final de ADN que pudiera estar presente en la muestra. No hubo diferencias significativas en la concentración presente en GEH y GENH ($p = 0,044$), por lo que consideramos que el paso de ebullición en estas muestras no cambiaría la concentración final de ADN en comparación si estas no son hervidas.

Respecto del índice de pureza del ADN, la medición obtenida a 260/280 y 260/230 nm, es una herramienta ampliamente utilizada para evaluar la correcta extracción de ADN, proceso que debe resguardar su integridad con la menor contaminación posible, a fin de obtener un buen rendimiento y funcionalidad al momento de su análisis (74,76). Mediante espectrofotometría se

puede determinar la pureza de una muestra de ADN basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. La relación A260/280 es muy estable, mientras que la relación A260/230 es más variable, dependiendo de factores como la concentración de ADN o composición del tampón de resuspensión de la muestra (61). La relación A260/280 permite verificar la contaminación por proteínas, que son las que absorben a 280 nm (77), mientras que a 230 nm absorben contaminantes como sales caotrópicas, fenoles o carbohidratos. La extracción de reactivos como la guanidina, fenol y el EDTA, también pueden contribuir a la absorbancia entre 230 nm y 280 nm, y su presencia en las muestras aún en cantidades residuales, puede afectar los resultados de medición (60).

No existen trabajos que determinen si la pureza del ADN influye en la cuantificación de *T. cruzi* por qPCR, desde muestras de sangre total en GE hervida, GE no hervida y/o capa leucocitaria. En este estudio, se pudo determinar que a A260/A280 las muestras provenientes de CL no presentaron contaminantes de ningún tipo (proteínas o ARN), mientras que la contaminación de las muestras en GEH y GENH estuvo dada principalmente por ARN. Respecto a la pureza obtenida A260/230, esta se presentó con mayor variabilidad entre los grupos de muestras, donde fue posible detectar contaminaciones en todos los grupos. Dentro de estos posibles contaminantes, se descarta el fenol, ya que tanto las muestras recolectadas como el kit de extracción utilizado no usan este compuesto. Sin embargo, es posible que en el caso de las muestras en GEH y GENH hayan quedado cantidades residuales tanto de Guanidina y EDTA (componentes del buffer), siendo la causa de los contaminantes presentes, considerando además que el clorhidrato de Guanidina corresponde a un agente caotrópico, mientras que, en las muestras de CL, estos contaminantes sólo podrían atribuirse a cantidades residuales de EDTA (anticoagulante del tubo de recolección).

Otros autores han estimado que los lisados de sangre promueven el daño del ADN kinetoplastídico de *T. cruzi* de una manera dependiente del tiempo, que reduce la capacidad de detección del ADN genómico de un agente infeccioso por PCR. La alta concentración de proteínas desnaturalizadas con clorhidrato de Guanidina en estas condiciones de almacenamiento probablemente denota una lisis de ADN kinetoplastídico no enzimática (78). Respecto a esto, en este estudio, el kit de extracción utilizado incluye una etapa donde se utiliza proteinasa K al inicio de la lisis de la muestra. Esta enzima es utilizada para digerir proteínas presentes en la muestra, por tanto, es posible obtener un ADN con bajo contenido proteico,

disminuyendo así los contaminantes asociados, tal como se ve en este estudio, en todos los tipos de muestra. Cabe señalar, que según la literatura, estos índices de pureza obtenidos a distintas relaciones de absorbancias sólo tendrían validez con concentraciones altas de ADN (aproximadamente >50 ng/uL) (61). En este estudio, 13 muestras en GEH, 7 en GENH y 4 de CL, presentaron concentraciones bajo 50 ng/ul, por lo que la determinación de pureza en estas muestras podría ser más variable o la precisión de estos resultados disminuye.

Aunque los índices de pureza son indicadores importantes de la calidad de la muestra, el mejor indicador de calidad es la funcionalidad de la aplicación de recuperación y purificación de interés (p. ej., PCR en tiempo real) (60), y por lo que pudimos evidenciar, desde las muestras que presentaron ciertos contaminantes, de igual forma se pudo realizar la determinación de la presencia de *T. cruzi* y cuantificación de la carga parasitaria.

De esto, se podría concluir que las muestras obtenidas en GE y posteriormente hervidas (grupo control), tienen la desventaja de presentar baja concentración de ADN, sumando algunas impurezas. Si bien en los tres tipos de muestra se observa contaminación a 260/230, al evaluar parámetros de contaminación con ARN y alta contaminación (que podría afectar la funcionalidad del ADN), la CL podría ser la muestra de elección al presentar mayor concentración de ADN y menor cantidad de contaminantes.

Por tanto, nuestra propuesta, al considerar las variables concentración y pureza del ADN blanco en la cual se aplicará qPCR, la muestra de elección para detección de *T. cruzi* y determinación de la carga parasitaria directamente en muestras de sangre periférica de pacientes con ECh crónica, es la CL, con el protocolo sugerido en el presente estudio.

La técnica de qPCR para la cuantificación absoluta de *T. cruzi* aplicada en el presente estudio, así como numerosos trabajos de investigación relacionados, requiere de la implementación de una curva estándar de calibración (13,46,50,65,79), la cual es preparada habitualmente con formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtenidas de cultivo axénico, considerando como punto inicial 1×10^6 parásitos-equivalentes/mL. No obstante, existen diferencias en los protocolos de preparación de la curva, relacionados fundamentalmente con: a) cepa (única o mezcla) de *T. cruzi* utilizada en la preparación de la curva, tales como Tulahuen (80), Sylvio X10 y Cl-Brener (50), Dm7, Dm28c, IV, Vcl4, CM17 y Dog Theis (51), b) elaboración de la curva entre 10^6 y 1 parásito-equivalente/mL mediante 3 protocolos: ADN de muestras de donante sano recibida en GE y experimentalmente contaminada con 10^6 epimastigotes de *T. cruzi* antes de la extracción

de ADN, diluciones seriadas de ADN extraído de muestras de sangre con GE experimentalmente infectada con 10^6 epimastigotes de *T. cruzi* y diluciones seriadas de ADN extraído de epimastigotes de *T. cruzi* de cultivo axénico (51); ADN de sangre humana seronegativa contaminada con epimastigotes de *T. cruzi* de cultivo y posteriormente mezclada 1:1 con GE (50, 79) e iniciando la curva estándar con 1×10^6 parásitos/mL con un rango dinámico de detección entre 1×10^5 y 1×10^1 parásitos/mL (79). En el presente estudio, se cuantificó el ADN de *T. cruzi* equivalente a 1×10^6 epimastigotes/mL, de acuerdo a la masa de una célula parasitaria y se contaminó un pool de ADN de sangre periférica recibida en GE de varios individuos serológicamente negativos para ECh. Las diluciones en orden de 10 fueron realizadas para generar una curva estándar de cuantificación para qPCR con un límite superior e inferior de 1×10^5 y 1×10^1 parásitos/mL. Finalmente, otro punto de diferencia entre los diferentes estudios, es el DTU de *T. cruzi* aplicado, existiendo amplia diversidad, considerando que existen al menos 6 DTUs de *T. cruzi* (81). Como se mencionó anteriormente, en nuestro estudio, la curva estándar se preparó con una mezcla 1:1 de los dos DTUs que circulan más frecuentemente en Chile, correspondientes a los DTUs I (Dm28c) y II (Y) (47,63,64). En este estudio, y en la literatura existente, las curvas estándar cumplen habitualmente con los valores de R^2 (Linealidad), Y (Pendiente) y Eff (Eficiencia) internacionalmente establecidos y aceptados (**Tabla 4**). En nuestra experiencia, el punto crítico de la curva lo constituye la determinación de su punto inicial que corresponde a 1×10^6 parásitos/mL, el cual debe ser, en nuestra opinión cuantificado a fin de no sub o sobre-estimar el número de parásitos observados en una cámara de Neubauer, como también se utiliza en algunos trabajos (82).

Por otro lado, en las reacciones de qPCR es habitual incluir un control interno de reacción, que además puede servir como control de extracción de ADN. Si una muestra al ser evaluada paralelamente para *T. cruzi* y control interno de reacción, arroja un resultado negativo para ambos ensayos, la reacción es considerada inválida puesto que lo más probable es que el resultado se deba a ausencia de ADN en la reacción. Un resultado negativo para *T. cruzi* se valida sólo si la reacción para el control interno de reacción es positiva.

Desde los inicios de la aplicación de qPCR para la detección y cuantificación de *T. cruzi* a nivel latinoamericano, han sido utilizados diversos controles internos de amplificación (endógenos o exógenos), conocidos como IAC (“Internal amplification control”) (13,46,58), siendo el más frecuente un plásmido recombinante (pZErO-2) que contiene un inserto de la secuencia de

Arabidopsis thaliana, aquaporina que fue descrito como IAC heterólogo extrínseco por Duffy *et al.* (2009). Otros autores, como Piron *et al.* (2007), han aplicado el gen humano de la RNase P como control interno de co-amplificación en la determinación de carga parasitaria por *T. cruzi* en muestras de sangre periférica. En nuestro laboratorio, debido a la imposibilidad de disponer del plásmido recombinante mencionado, se ha creado y aplicado un sistema de control interno endógeno, utilizando parte de una secuencia del cromosoma 12 humano (X12) (83), el que ha sido eficientemente amplificado por muestras de estudios anteriores. En este estudio se utilizó el control de reacción IPC (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Applied Biosystems) (68), sugerido por otros autores expertos en esta metodología (32,62). Se co-amplificó eficientemente en modalidad PCR multiplex y se evidenció eficacia en la validación de resultados, puesto que todas las muestras tuvieron qPCR positivo para el IPC, como fue descrito en resultados.

El diagnóstico parasitológico en la ECh crónica constituye un desafío para el laboratorio, debido a las bajas y fluctuantes cargas parasitarias características de esta fase de la infección (84). En años previos al desarrollo de la biología molecular y aplicación de PCR, el hemocultivo y el xenodiagnóstico constituían las herramientas de elección para la detección de *T. cruzi* circulante, favorecido por la amplificación parasitaria artificial y natural en el vector biológico, respectivamente (85,86). Muchos estudios evidenciaron la utilidad de PCR convencional que permitió aumentar de manera significativa la sensibilidad de detección de *T. cruzi*, especialmente en muestras de sangre recibidas en GE (87). No obstante, ninguna de estas técnicas permitía cuantificar la parasitemia circulante, fundamental en casos de evaluación de eficacia quimioterapéutica (65,88,89). Fue así como surgieron los primeros estudios de aplicación de PCR tiempo real en ECh (50,79,90) y trabajos colaborativos para su estandarización (13,46), los que han diferido en tipo de muestra, secuencia blanco, elaboración de curvas de calibración, límites de detección y otras variables. Desde una perspectiva global, sin considerar las variables mencionadas, se han reportado, para la ECh crónica, sensibilidades del 41% y cargas parasitarias entre 0,8 y 2 par-eq/mL aplicando qPCR-TaqMan® (79); sensibilidad de 71,3%, con cargas de 1,93, 2,31 y 0,1 par-eq/mL al aplicar qPCR-TaqMan® en pacientes argentinos, colombianos y brasileños, respectivamente, con cardiopatía chagásica crónica (51); Apt *et al.* (2016), reportan, luego de aplicar qPCR-Taqman® en 400 pacientes con ECh crónica con y sin cardiopatía, un 73% de sensibilidad en la detección de *T. cruzi* con rangos

de parasitemia entre 0,006 y 7,9 par-eq/mL.

Nuestros resultados de detección son semejantes a los estudios mencionados, sobre todo con Pirón *et al.* (2007), utilizando el mismo sistema de detección de qPCR, ya que la positividad global de nuestra detección mediante qPCR-TaqMan® fue del 49% (26 de 53 casos) considerando una, dos o los tres tipos de muestras analizadas. La positividad por grupo de estudio fue de 35,8% (19 casos) en GEH, 32% (17 casos) en GENH y 34% (18 casos) en CL (**Tabla 8**), sin diferencias estadísticamente significativas entre la cantidad de muestras detectadas por grupo ($p=0,92$). Hubo mayor positividad al analizar los tres tipos de muestras en conjunto (38,4%), mientras que, al analizar una o dos muestras, el porcentaje de positividad fue el mismo (30,8%), entonces, si sólo se hubiesen analizado muestras de sangre en GEH, 7 individuos positivos no hubiesen sido pesquisados, mientras que si sólo se hubiese estudiado las muestras de sangre en GENH, 9 individuos positivos no habrían sido detectados con parásitos circulantes en este grupo de muestras. En cambio, si sólo se hubiesen analizado las muestras provenientes de CL, 8 individuos no hubiesen sido detectados como positivos.

Por otro lado, las mayores y menores cargas parasitarias **detectables** se ubicaron en los rangos de $\geq 10-100$ y $\geq 0,01-0,09$ par-eq/mL, con el 3,7% y 26% de los casos, respectivamente (**Tabla 9**). Respecto a las parasitemias globales, es decir, en los 26 casos positivos, las parasitemias fluctuaron entre cargas muy bajas incluso menores a 0,1 par-eq/mL, las cuales se concentraron mayormente en el grupo de las muestras GENH, mientras que las parasitemias más elevadas, se observaron en las muestras de CL. Los promedios de carga parasitaria en orden decreciente fueron CL (2,90 par-eq/mL), GENH (2,11 par-eq/mL) y GEH (0,27 par-eq/mL), con una DS mayor en las muestras de capa leucocitaria (**Tabla 10**). Por tanto, al aplicar el criterio de interpretación establecido para casos **cuantificables** obtenidos por qPCR, fue posible cuantificar la carga (sobre 0,1 par-eq/mL) en 9 casos de GEH, 17 casos de GENH y 14 casos de CL, sin diferencias significativas ($p=0,19$) (**Tabla 11**).

Al establecer los casos que fueron simultáneamente **detectables** (positivos) para los tres tipos de muestras analizadas (recordando que provienen desde una misma punción por paciente), 10 casos cumplieron con este criterio, los cuáles presentaron rangos de parasitemia entre 0,08 a 1,29 par-eq/mL en GEH, entre 0,37 a 7,55 par-eq/mL en GENH y entre 0,03 a 18,43 par-eq/mL en CL, encontrándose diferencias estadísticamente significativas sólo entre los promedios de parasitemias obtenidas en GEH (0,45 par-eq/mL) y GENH (2,42 par-eq/mL) ($p= 0,013$). Pese a

que el promedio de las cargas encontradas en CL fue más elevado (4,85 par-eq/mL), no hubo diferencias estadísticamente significativas con los otros grupos, debido a la alta variabilidad intragrupo (**Tabla 12**). Finalmente, fue analizada la carga de los casos **cuantificables** ($\geq 0,1$ par-eq/mL) simultáneamente para los tres tipos de muestras, donde sólo 7 casos cumplieron con este criterio, con promedios de 0,58 par-eq/mL en GEH, 3,22 par-eq/mL en GENH y 6,32 par-eq/mL en CL, sin diferencias significativas, descrito en resultados (**Tabla 13**).

En un estudio de Duffy *et al.* (2013), para validación de qPCR-Taqman®, utilizaron muestras de sangre en GENH y GEH de 63 pacientes bolivianos y 63 pacientes argentinos, respectivamente, con ECh crónica, donde detectaron 60,3% de positividad en muestras de GENH y 76,5% en GEH, con cargas parasitarias más bajas en muestras en GENH, donde sólo 3 de 38 muestras positivas fueron cuantificables (1,25; 1,44 y 1,45 log 10 par-eq/10 mL), indicando que la mayoría de los pacientes de este grupo presentaron cargas parasitarias muy bajas, donde muchos de ellos dieron resultados detectables pero no cuantificables, según su método. Ellos estiman que la incubación de las muestras durante 15 minutos favoreció la fragmentación o deconcatenación de los minicírculos y la distribución de minicírculos individuales en todo el volumen de la muestra, permitiendo el procesamiento de pequeños volúmenes (100 μ L) con una sensibilidad satisfactoria, obteniendo así una sensibilidad ligeramente mayor utilizando GEH versus GENH (0,46 frente a 0,70 par-eq/mL, respectivamente; $p=0,044$), estimando que las mayores cargas parasitarias encontradas en estos casos estuvieron parcialmente influenciadas por el paso de ebullición. Sin embargo, ellos consideran que el procedimiento de calentamiento podría aumentar el riesgo de contaminación cruzada entre las muestras, dando lugar a falsos positivos, continuaron su validación de qPCR utilizando muestras enriquecidas no hervidas. Este estudio difiere con el nuestro, ya que nosotros detectamos cargas en intervalos más bajos en GEH vs GENH, obteniendo en 10 de los 19 casos detectados en GEH intervalos entre 0,04 y 0,08 par-eq/mL, es decir casos positivos detectables pero no cuantificables según nuestro método, mientras que en GENH todas las muestras presentaron cargas parasitarias sobre 0,1 par-eq/mL, con promedios mayores en GEH. Por otro lado, Qvanstrom *et al.* (2012), usando mayormente muestras de sangre con EDTA, además de sangre completa para determinar el efecto de la concentración de la CL en la sensibilidad del análisis de qPCR-Taqman® en pacientes con sospecha de ECh aguda o reactivada, que vivían en EE. UU., en 26 muestras (de 10 pacientes) encontraron niveles

detectables de ADN de *T. cruzi* tanto en sangre entera como en CL, con una concentración relativamente más alta en esta última, lo cual coincide con nuestro estudio, pese a que utilizamos muestras de pacientes con ECh crónica donde la parasitemia es baja y fluctuante. Qvanstrom *et al.* (2012), informan que otras 9 muestras (de 6 pacientes) fueron positivas sólo en la CL, por lo tanto, el 26% de las muestras positivas se habrían notificado como negativas para *T. cruzi* si no se hubiese analizado la CL. Para tres pacientes de su estudio, el análisis de CL fue crucial, ya que la reactivación de la enfermedad en dos pacientes se detectó dos semanas antes al comparar la muestra de CL con la sangre total y un paciente que adquirió la enfermedad a través de trasplante se identificó como positivo una semana antes al analizar la capa leucocitaria en comparación con la sangre completa. Estas observaciones son concordantes con nuestros resultados, ya que, en los 26 casos detectados en nuestro estudio, 3 pacientes habrían resultado negativos si no se hubiese analizada la CL.

Por último, Ramírez *et al.* (2015), en estudios de pacientes con ECh crónica usando muestras de sangre total en GEH, para SatDNA y qPCR, reportaron parasitemias entre 1,61 y 2,46 par-eq/mL, mientras que en hemocultivo obtuvieron cargas entre 1,68 y 15,54 par-eq/mL. En nuestro estudio, los intervalos de parasitemias obtenidos en las muestras en GEH y GENH son semejantes a estos estudios previos, mientras que las parasitemias obtenidas de CL, se asemejan a las cargas obtenidas en hemocultivos.

Por otra parte, como lo ha evidenciado el análisis estadístico, existe cierta asociación entre la concentración total del ADN y la carga parasitaria, en todos los tipos de muestras considerando los últimos 7 casos positivos cuantificables, y siendo mayor para las muestras de CL. Al igual que en este estudio, otros investigadores han estimado que el ADN extraído desde CL en una muestra de sangre que contiene tripomastigotes de *T. cruzi* debería concentrar más ADN del parásito que el volumen correspondiente de sangre total (55).

En este estudio, se ha determinado que las muestras provenientes de CL, presentan concentraciones más altas de ADN total, y a la vez parasitemias más altas, aumentando así el promedio de la carga parasitaria. En el caso de las muestras en GENH versus las muestras en GEH, se evidenciaron promedios más altos de parasitemias, pero no parasitemias tan bajas, lo cual nos hace preguntarnos por un lado, si la sensibilidad de la qPCR en este grupo de muestras es más baja en comparación a los otros tipos de muestras debido a que no se detectaron cargas parasitarias inferiores a 0,1 par/eq/mL, dado probablemente por no hervir las muestras para

aumentar así la deconcatenación de los minicírculos (en el caso de los 10 casos concordantes positivos), o bien, de igual modo a lo que sucede en la capa leucocitaria, logra concentrar mayor cantidad de ADN parasitario, probablemente porque no ocurre daño del ADN por sometimiento al calor, sin embargo, aun así poseería menor sensibilidad que las muestras en GEH y CL, al considerar los 10 casos detectables simultáneamente por los tres tipos de muestras. Pese a esto, no podemos determinar fehacientemente esta diferencia, debido a que al analizar los 7 casos cuantificables, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de las parasitemias entre los grupos, por lo que consideramos necesario, aumentar el número de muestras que cumplan estas consideraciones (positivos en los tres tipos de muestras) en posteriores estudios.

Sin embargo, existen otras características intrínsecas a las muestras de estos pacientes, que podrían estar influyendo en la positividad por qPCR y/o carga parasitaria de las muestras, como son los antecedentes genéticos del hospedero y el estado inmunológico que, a su vez, pueden desempeñar un papel en el control de la replicación parasitaria, o también un factor relacionado con los DTU de *T. cruzi* circulantes en el paciente (50,91). Las variables mencionadas y que no fueron abordadas en el presente estudio, podrían estar influyendo en los niveles de parasitemia obtenidos en los distintos tipos de muestras.

7. CONCLUSIONES

La aplicación de qPCR-Taqman® en muestras de sangre procesadas bajo diferentes protocolos de obtención y procesamiento de muestras, confirma las bajas parasitemias circulantes en individuos con ECh crónica pese al mejoramiento de condiciones de concentración. Las bajas cargas parasitarias obtenidas en el presente estudio, continúan siendo un importante desafío para el diagnóstico parasitológico de la ECh crónica. No se encontraron diferencias significativas entre las parasitemias obtenidas en los tres tipos de muestras analizadas, pero existe una correlación entre la concentración de ADN total y la carga parasitaria obtenida en todos los tipos de muestras, siendo mayor en las muestras de capa leucocitaria.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apt W. Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas). 2013. En Apt W. Parasitología humana. McGrawHill Interamericana Editores. Cap. 41:282-297.
2. Pérez-Molina J, Molina I. 2018. Chagas disease. Lancet. 391: 82-94.
3. Apt W, Carrasco D, Fuentealba C, Canals M, Muñoz G, Saavedra M, Castillo JP, Zulantay I. 2019. Chronic Chagas disease: Quantification of *Trypanosoma cruzi* in peripheral blood and dejections of *Triatoma infestans* fed by xenodiagnosis in patients with and without cardiopathy. Acta Trop. 200:105167.
4. World Health Organization (WHO). Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). 2020. Disponible en [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (Último acceso 19 de agosto 2022)
5. Ceballos-Pomares JC, Cuéllar-Rufino S, Vázquez-Ortega MF, López-Domínguez J, Romero-Cruz V, Calderón-Garcidueñas AL. 2017. Inmunología de la enfermedad de Chagas congénita. Perinatol Reprod Hum. 31 (3): 144-150.
6. Denegri M, Oyarce A, Larraguibel P, Ramírez I, Rivas E, Arellano G, Báez A, Maulén N. 2020. Cribado y transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en población usuaria del Hospital Dr. Félix Bulnes Cerda y Atención Primaria de Salud del Servicio de Salud Metropolitano Occidente de Santiago, Chile. Rev Chil Infectol. 37 (2): 129-137.
7. Simioli F, Sánchez-Cunto M, Velázquez E, Lloveras S, Orduna T. 2017. Enfermedad de Chagas en el sistema nervioso central en paciente con infección por VIH: dificultades diagnósticas y terapéuticas. Rev Chil Infectol. 34 (1): 62-66.
8. Fernández MDP, Gaspe MS, Gürtler RE. 2019. Inequalities in the social determinants of health and Chagas disease transmission risk in indigenous and creole households in the Argentine Chaco. Parasit Vectors. 12(1): 184.
9. Ramírez JC, Parrado R, Sulleiro E, de la Barra A, Rodríguez M, Villarroel S, Irazu L, Alonso-Vega C, Alves F, Curto MA, García L, Ortiz L, Torrico F, Gascón J, Flevaud L, Molina I, Ribeiro I, Schijman AG. 2017. First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease. PLoS One. 12(11): e0188550.
10. Duschak VG. 2019. Major Kinds of Drug Targets in Chagas Disease or American Trypanosomiasis. Curr Drug Targets. 20 (11):1203-1216.

11. Abras A, Ballart C, Llovet T, Roig C, Gutiérrez C, Tebar S, Berenguer P, Pinazo MJ, Posada E, Gascón J, Schijman AG, Gállego M, Muñoz C. 2018. Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: A comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. PLoS One. 13 (4): e0195738.
12. De Souza W, de Carvalho TM, Barrias ES. 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010: 295394.
13. Ramírez JC, Cura C, da Cruz O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, *et al.* 2015. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. J Mol Diag. 17 (5): 605-15.
14. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 26(2): 275-291.
15. Pinazo MJ, Torrico F, Gascón J. 2015. Pathogenesis of Chagas Disease in Humans. Human Emerging and Re-emerging Infections. Chapter 19; 349-369.
16. Saldías F & Zúñiga R. 2019. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica. Evaluación parasitológica en el punto final de seguimiento prolongado (8 a 10 años). Tesis profesional para optar al título de Tecnólogo Médico con especialidad. Escuela de Tecnología Médica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 69 pág.
17. MINSAL, Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. Norma General Técnica. Control y Prevención Nacional de la Enfermedad de Chagas. 2014. Disponible en https://www.minsal.cl/sites/default/files/NORMA%20TECNICA_CHAGAS_FINAL.pdf (Último acceso el 19 de agosto de 2022).
18. Frías-Laserre D, González CR, Reyes C, de Carvalho DB, Oliveira J, Canals M, da Rosa J.A. 2017. Wing polymorphism and *Trypanosoma cruzi* infection in wild, peridomestic and domestic collections of *Mepraia spinolai* (Hemiptera: Reduviidae) from Chile. J Med Entomol. 54: 1061-1066.
19. Campos-Soto R, Díaz-Campusano G, Quiroga N, Muñoz-San Martín C, Rives-Blanchard N, Torres-Pérez F. 2020. *Trypanosoma cruzi*-infected triatomines and rodents co-occur in a coastal island of northern Chile. PeerJ. 8: e9967.

20. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2020. Vigilancia de laboratorio de la infección por *Trypanosoma cruzi* Chile, 2012-2019. Boletín Vigilancia de Laboratorio. Vol. 10, No. 9.
21. Salas P. 2020. Epidemiología de la enfermedad de Chagas: alta mortalidad y tasa de incidencia, Región de Coquimbo. Rev Chil Infectol. 37 (4): 402-412.
22. Encuesta Nacional de Salud-Chile: 2016- 2017. Ministerio de Salud-Gobierno de Chile. Disponible en: http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2022/01/2022.01.03_Informe-Enfermedad-de-Chagas.pdf (Último acceso 19 de agosto 2022).
23. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2017. Informe Estrategia Integrada de Prevención y Control de la Enfermedad de Chagas. 12 pág, .
24. Canals M, González C, Canals L, Canals A, Cáceres D, Alvarado S, Cattán PE, Saavedra M, Zulantay I, Apt W. 2017. What do the numbers tell us about the temporal evolution of Chagas' disease? Rev Chil Infectol. 34(2): 120-127.
25. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. 2018. Vigilancia de Enfermedad de Chagas 2014-2017: Componente vectorial. 8 (3).
26. Ayala S, Alvarado S, Cáceres D, Zulantay I, Canals M. 2019. Effects of climate change on reproductive number of Chagas disease. Rev Med Chil. 147(6):683-692.
27. Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, León C, Ramírez JD. 2016. Molecular Diagnosis of Chagas Disease in Colombia: Parasitic Loads and Discrete Typing Units in Patients from Acute and Chronic Phases. PLoS Negl Trop Dis. 10(9): e0004997.
28. De la Rosa E, Paglini-Oliva P, Prato LB, Benizio E, Triquell MF, Muñoz SE, Fernández EA. 2018. Early Detection of Chronic Asymptomatic Chagas Infection. Med Sci Monit. 24: 4567-4571.
29. Tarleton RL, Curran JW. 2012. Is Chagas Disease Really the “New HIV/AIDS of the Americas”? PLoS Negl Trop Dis. 6(10): e1861.
30. Liempi D, Zulantay I, Apt W, Canals M, Fredes F. 2020. Diagnóstico serológico y molecular aplicado a las parasitosis prevalentes y emergentes en Chile: Puesta al día. Rev Parasitol Latinoam. 69 (2): 13-42.
31. Ministerio de Salud. Gobierno de Chile. 2017. Manual de Procedimientos para la atención de pacientes con Enfermedad de Chagas. 64 pág.

32. Ramírez JC & da Cruz Moreira O. 2019. Assessing Parasite Load in Chagas Disease Patients by Quantitative Multiplex Real-Time PCR. *Methods Mol Biol.* 1955: 215-225.
33. Muñoz G, Vergara C, Martínez G, Apt W, Zulantay I. 2019. Quantification of Immunoglobulin G against *Trypanosoma cruzi* in Individuals with Chronic Chagas Disease Treated with Nifurtimox and Evaluated in Prolonged Follow- Up. *Korean J Parasitol.* 57(1): 39-41.
34. Afonso AM, Ebell MH, Tarleton RL. 2012. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11): e1881.
35. Organización Panamericana de la Salud. 2015. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. 172: 12-13.
36. Rassi A Jr, Marin JA Neto, Rassi A. 2017. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 112(3): 224-235.
37. Valencia C, Mancilla M, Ramos D, Zulantay I, Molina M, Torres A, Corral G, Apt W. 2012. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica en Chile. Efectos adversos de Nifurtimox. *Rev. Ibero-Latinoam.Parasitol.* 71: 97-108.
38. Forsyth CJ, Hernandez S, Olmedo W, Abuhamidah A, Traina MI, Sanchez DR, Soverow J, Meymandi SK. 2016. Safety Profile of Nifurtimox for Treatment of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 63(8): 1056-1062.
39. Apt, W. Treatment of Chagas disease. 2017. En Tellería & Tibayrenc. *American tripanosomiasis Chagas disease.* Elsevier; Chapter 31, 2:751-771.
40. Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, Ramsey JM, Ribeiro I, Sosa-Estani S, López MC, Gascon J. 2014. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12(4): 479-96.
41. De Lana M, Martins-Filho OA. 2015. Revisiting the Post therapeutic Cure Criterion in Chagas Disease: Time for New Methods, More Questions, Doubts, and Polemics or Time to Change Old Concepts? *Biomed Res Int.* 2015: 652985.

42. Saavedra, M., Zulantay, I., Apt, W. Castillo J, Araya E, Martínez G, Rodríguez J. 2016. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors*. 9, 382.
43. Zulantay I, Apt W, Valencia C, Torres A, Saavedra M, Rodríguez J, Sandoval L, Martínez G, Thieme P, Sepúlveda E. 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J Antimicrob Chemother*. 66 (10): 2224-2226.
44. Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Martínez G, Rojas A, Rodríguez J. 2013. Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res*. 46(3): 295-298.
45. D'Ávila DA, Galvão LMC, Sousa GR, Britto C, Moreira OC, Chiari E. 2018. Monitoring the parasite load in chronic Chagas disease patients: comparison between blood culture and quantitative real time PCR. *PLoS One*.13 (11): e0208133.
46. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, *et al*. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(1): e931.
47. Muñoz-San Martín C, Apt W, Zulantay I. 2017. Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infect Genet Evol*. 49:300-308.
48. Bern C. 2015. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 373(5): 456-66.
49. Alonso-Padilla J, Cortés-Serra N, Pinazo MJ, *et al*. 2019. Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 17(3): 145-157.
50. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, *et al*. 2013. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(1): e2000.
51. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, *et al*. 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. 125(1): 23-31.

52. Cura CI, Duffy T, Lucero RH, *et al.* 2015. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. PLoS Negl Trop Dis. 9(5): e0003765.
53. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Saavedra M, Araya E, Solari A, Ortiz S, Arriagada K, Rodríguez J. 2015. *Trypanosoma cruzi* burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy. Parasitol Res. 114(8): 3007-3018.
54. Muñoz-San Martín C, Zulantay I, Saavedra M, Fuentealba C, Muñoz G, Apt W. 2018. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* detected by real-time PCR in Chilean patients with chronic Chagas cardiomyopathy. Acta Trop. 185: 280-284.
55. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. 2012. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. PLoS Negl Trop Dis. 6(7): e1689.
56. Agilent Technologies, Inc. 2010. Assay optimization. En: Introduction to quantitative PCR: Methods and Applications Guide. 45-58.
57. ThermoFisher. TaqMan® vs SYBR® Chemistry for Real-Time PCR. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/cl/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (Último acceso 19 de agosto 2022).
58. Parrado R, Ramirez JC, de la Barra A, Alonso-Vega C, Juiz N, Ortiz L, Illanes D, Torrico F, Gascon J, Alves F, Flevaud L, Garcia L, Schijman AG, Ribeiro I. 2019. Usefulness of Serial Blood Sampling and PCR Replicates for Treatment Monitoring of Patients with Chronic Chagas Disease. Antimicrob Agents Chemother. 63(2): e01191-18.
59. E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit. Disponible en <https://www.omegabiotek.com/product/e-z-n-a-blood-dna-mini-kit/?cn-reloaded=1> (Último acceso 19 de agosto 2022)
60. Manual de usuario Nanodrop. Denovix DS-11FX Series Spectrophotometer. Disponible en: <https://www.denovix.com/pdf/ds-11-series-user-guide.pdf> (Último acceso 19 de agosto de 2022)
61. Programa de control de calidad de ácidos nucleicos. Banco Nacional de ADN Carlos III (Universidad de Salamanca). Disponible en: <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf> (Último acceso 19 de agosto 2022)

62. Finamore-Araujo P, Faier-Pereira A, Ramon do Nascimento Brito C, Gomes Peres E, Kazumy de Lima Yamaguchi K, et al. 2021. Validation of a novel multiplex real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection and quantification in açai pulp. PLoS One 16(2): e0246435.
63. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. 2016. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. PLOS Negl Trop Dis. 10(8): e0004792.
64. Zulantay, I.; Muñoz, G.; Liempi, D.; Rozas, T.; Manneschi, M.J.; Muñoz-San Martín, C, Botto-Mahan C., Apt, W., Cabrera, G. 2022. Discrete Typing Units of *Trypanosoma cruzi* Identified by Real-Time PCR in Peripheral Blood and Dejections of *Triatoma infestans* Used in Xenodiagnosis Descriptive Study. Pathogens 11(7): 787.
65. Duffy T, Bisio M, Altecheh J, Burgos J, Diez M, Levin M. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. PLoS Negl. Trop. Dis. 3 (4): e419-e.
66. Qubit Assay. ThermoFisher. Disponible en: https://www.thermofisher.com/cl/es/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/molecular-spectroscopy/fluorometers/qubit/qubit-assays.html?ef_id=Cj0KCQjw852XBhC6ARIsAJsFPN0taS0hVRltCroXOAhTKI2FpG3qmx2fXFL1yUSenUjAe8NhAZslkskaArWNEALw_wcB:G:s&s_kwid=AL!3652!3!529745253306!e!!g!!qubit%20dsdna%20hs%20assay%20kit&cid=bid_pca_aqb_r01_co_cp1359_pjt0000_bid00000_0se_gaw_bt_pur_con&gclid=Cj0KCQjw852XBhC6ARIsAJsFPN0taS0hVRltCroXOAhTKI2FpG3qmx2fXFL1yUSenUjAe8NhAZslkskaArWNEALw_wcB (Último acceso 01 de agosto 2022)
67. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, Roosens N, Morisset D. 2014. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends in Food Science & Technology 37(2): 115-126.
68. Applied Biosystems. TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents. Protocol. © Copyright 2001, Applied Biosystems.
69. Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in

- polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 88(1): 171-172.
70. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. J Clin Microbiol. 18: 327-330.
 71. Chagas C, Binkiené R, Ilgūnas M, Iezhova T, Valkiūnas G. 2020. The buffy coat method: a tool for detection of blood parasites without staining procedures. Parasit Vectors. 13: 104.
 72. Fitzwater S, Calderon M, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Ferrufino L, *et al.* 2008. 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. 79: 768-770.
 73. Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, *et al.* 2009. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. Mem Inst Oswaldo Cruz 104: 27-32.
 74. Cruz-Enríquez JA, Espinosa-Padilla SE, Medina-Torres EA. 2021. Importancia del adecuado protocolo de extracción de DNA para estudios moleculares. Alergia Asma Inmunol Pediatr. 30(2): 50-53.
 75. Chang A, Morera L, Ustariz C, Bencomo A. 2015. Optimización de la extracción de ácido desoxirribonucleico para la tipificación molecular de antígenos leucocitarios humanos. Revista Cubana de Hematol, Inmunol y Hemoter. 31(1): 59-64.
 76. López M, Rivera MG, Viettri M, Lares M, Morocoima A, Herrera L, Ferrer E. 2014. Comparación de dos protocolos de extracción de ADN de *Trypanosoma cruzi* cultivados en medio axénico [Comparing two protocols of DNA extraction of *Trypanosoma cruzi* cultured in axenic medium]. Rev Peru Med Exp Salud Pública 31(2): 222-227.
 77. Osorio J, Pachajoa H, Hurtado P. 2013. Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años. Rev Estomatol. Salud. 21(1): 35-38.
 78. Coronado X, Ortiz S, Lastra O, Larrondo M, Rozas M, Solari A. 2005. Instability of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood lysates: importance for PCR DNA-based diagnosis. Mol Diagn. 9(1): 35-40.

79. Pirón M, FISA R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez I Prat J, Portús M, Sauleda S. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103: 195-200.
80. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Saavedra M, Muñoz C, Toro B, Vega B, Rodríguez J. 2016. Chronic Chagas cardiopathy in Chile. Importance of *Trypanosoma cruzi* burden and clinical evaluation. *Acta Trop.* 162: 155-166.
81. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: ra-543 tionale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12, 240-253.
82. Querales M, Torres J, Graterol D, Arteaga R, Navarro M, Contreras V, Pineda W et al. 2013. Cambios metabólicos durante la epimastigogénesis in vitro de *Trypanosoma cruzi*. *Salus*, 17(3), 6-18.
83. Bravo N, Muñoz C, Nazal N, Saavedra M, Martínez G, Araya E, et al. 2012. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control. *Parasit Vectors.* 5: 59.
84. Schenone H, Rojass A. 1999. Longitudinal study, by xenodiagnosis, of parasitemia in patients with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Bol Chil Parasitol.* 54(1-2): 29-32.
85. Schenone H, Alfaro E, Rojas A. 1974. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica humana *Bol. Chil. Parasitol.* 29: 24-26.
86. Luz ZM, Coutinho MG, Caçado JR, Krettli AU. 1994. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de chagas [Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 27(3): 143-8.
87. Wincker P, Britto C, Pereira J, Cardoso M, Oelemann W, Morel C. 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.
88. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 6(10): 986-994.

89. Schijman AG; Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother.* 52(3): 441-449.
90. Cummings KL, Tarleton RL. 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol.* 129(1): 53-9.
91. Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, et al. 2010. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 51(5): 485-95.
92. Liempi D, Zulantay I, Apt W, Canals M, Fredes F. 2022. Mortalidad por parasitosis endémicas e importadas en Chile. 1997-2020. *Rev Chil Infectol.* 39(2), 138-148.

9. ANEXOS

Anexo 1. Acta de aprobación de Comité de Ética y Consentimiento informado



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

SANTIAGO, 09 de Julio de 2019.

Dr. Werner Apt Baruch
Programa de Biología Celular y Molecular
Laboratorio Parasitología Básico – Clínico
I.C.B.M
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Presente

Ref.: Proyecto 011-2017.

Estimado Dr. Apt:

El Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos (CEISH), con fecha 09 de Julio de 2019, informa a usted que toma conocimiento de carta recibida con fecha 01/07/2019 referente a su proyecto: "TOWARDS PERSONALIZED TREATMENT OF CHAGAS DISEASE BY MOLECULAR PROFILING OF PATIENTS AND PARASITES".

Ref.: Enmienda al Consentimiento informado

- Este Comité toma conocimiento y aprueba modificaciones al Consentimiento informado de dicho protocolo

Sin otro particular, le saluda atentamente,



Srta. Javiera Cobo Riveros
Secretaría Ejecutiva CEISH
COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN
EN SERES HUMANOS
FACULTAD DE MEDICINA

Proyecto Nº 011-2017
Archivo Carta Obs. 001

Teléfono: 29789536 Email: comiteceish@med.uchile.cl



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

DE PARTICIPACIÓN
PROYECTO EULACH16/TO2-0108 (2017-2020)

"HACIA EL TRATAMIENTO PERSONALIZADO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS BASADO EN ESTUDIOS MOLECULARES DE PACIENTES Y PARÁSITOS"

DE AUTORIZACIÓN
**USO DE ESTAS MUESTRAS BIOLÓGICAS
PARA OTROS ESTUDIOS RELACIONADOS**

Patrocinante: Universidad de Chile
Investigador principal: Werner Apt Baruch
RUT: 3.641.960-1
Institución: Universidad de Chile- Facultad de Medicina
Instituto de Ciencias Biomédicas
Programa Biología Celular y Molecular
Laboratorio Parasitología Básico-Clinico
Teléfonos: 229786122-229786123

Invitación a participar:

Le invitamos a participar en el proyecto de investigación: **"HACIA EL TRATAMIENTO PERSONALIZADO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS BASADO EN ESTUDIOS MOLECULARES DE PACIENTES Y PARÁSITOS"**, debido a que en las pesquisas de la enfermedad de Chagas, se ha confirmado a través de exámenes de sangre que Ud. tiene la enfermedad de Chagas.

Objetivo General:

Determinar si las características genéticas del hospedero y del parásito podrían tener valor pronóstico en el desarrollo de la cardiopatía chagásica y en la respuesta al tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Requisitos para entrar en el estudio (criterios de inclusión)

- Edad: 18 años o más
- Diagnóstico serológico enfermedad de Chagas (dos pruebas distintas)
- Consentimiento Informado por escrito

Procedimientos

1. Firma del Consentimiento Informado
2. Realizar encuesta epidemiológica (antecedentes familiares, de vivienda, de contacto con vinchucas e información relacionada sobre cómo adquirió la infección; madre infectada, transfusión, etc.) en el grupo de estudio

1



09 JUL 2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

3. Ficha clínica. Anamnesis, examen físico y co-morbilidad.
4. Determinar mediante trazado electrocardiográfico de 12 derivaciones la condición de compromiso cardíaco, según criterios de la Asociación del Corazón de Nueva York, Estados Unidos (Grupos I al IV).
5. Ecocardiograma en casos de ECG alterado
6. Obtener material para estudio genético del hospedero (estudio que se realizará en Alemania) y del parásito, consistente en una muestra de sangre venosa (10 cc), procedimiento que no constituye peligro alguno para su salud.

Costos del estudio

Su participación en este estudio no tiene costo alguno para Ud. La atención de médico parasitólogo (Dr. Werner Apt) y los diferentes exámenes de laboratorio realizados en Chile y en Alemania, son gratuitos.

Beneficios del estudio:

Su participación en este estudio le permitirá conocer el estado de su afección y contar con los parámetros parasitológicos, electrocardiográficos (y ecocardiográficos en algunos casos), para su eventual tratamiento.

Compensación por participar en este estudio:

Usted recibirá compensación económica para trasladarse al lugar de control (\$5.000 por visita).

Confidencialidad de la información derivada de este estudio:

Toda la información obtenida de su participación en este estudio será confidencial. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de esta investigación será anónima.

Voluntariedad:

Su participación en este estudio es absolutamente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicando esta determinación al investigador.

Resguardo de las muestras biológicas:

Serán almacenadas en congeladores del Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la responsable de las muestras será la Dra. Inés Zulantay Alfaro (56-2 229786122). Las muestras serán utilizadas sólo para este estudio, en caso de ser utilizadas en otras investigaciones, se solicitará su autorización. Las muestras que se conserven al término del estudio serán mantenidas a -20°C por si pudiesen servir a futuro. Si usted decide retirarse voluntariamente de este estudio, sus muestras serán eliminadas.



09 JUL 2019



UNIVERSIDAD DE CHILE
 FACULTAD DE MEDICINA
 COMITÉ DE ÉTICA DE LA
INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS

Uso de muestras biológicas para futuros estudios de investigación

En caso que las muestras del presente proyecto sean necesarias para futuros estudios de investigación, autorizo que sean resguardadas bajo confidencialidad en el Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Derechos del participante:

Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con el "Presidente del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos" Dr. Manuel Oyarzún G., Teléfono: 229789536, email: comiteceish@med.uchile.cl, cuya oficina se encuentra ubicada a un costado de la Biblioteca Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile en Avenida Independencia 1027, Comuna de Independencia, Santiago.

Dejo constancia que recibo una copia firmada de este consentimiento

_____	_____	_____
Nombre del paciente	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre de informante	Firma	Fecha

<u>DR. WERNER APT</u>	_____	_____
Nombre del investigador	Firma	Fecha

Coordinador General del Proyecto EU-LAC Health 2018-2020

Dr. Justo Lorenzo Bermejo
 Universidad de Heidelberg
 Alemania

Investigadores asociados

Dra. Inés Zulantay
M.V. Gabriela Muñoz
Dr. Marcelo Llancaqueo
Dr. Nelson Varela
T.M. Cristian Fuentealba
T.M. Daniela Carrasco
 Facultad de Medicina
 Universidad de Chile
 2229786753



09 JUL 2019

Anexo 2. Consentimiento informado Servicio de Salud Coquimbo.



MCT

RESOLUCION COMITE ETICO CIENTIFICO

**A: DR. WERNER APT BARUCH
INVESTIGADOR PRINCIPAL**

El Comité Ético Científico del Servicio de Salud Coquimbo, con fecha 12.01.2018, analizó Proyecto de Investigación **"Hacia un tratamiento personalizado de la Enfermedad de Chagas basado en los perfiles moleculares de pacientes y parásitos"**

CEC analizó:

1. Proyecto de Investigación in extenso
2. CV del Investigador Responsable y los Co-investigadores
3. Formulario de Consentimiento Informado del 08.11.2017
4. Acta de aprobación del Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina , Universidad de Chile, 08.11.2017

El proyecto y los documentos señalados, han sido analizados siguiendo las pautas de ética nacionales e internacionales, declaración de Helsinki, pautas CIOMS y Guía de Buenas Prácticas Clínicas de ICH 1996.

Este Comité Ético Científico aprueba la realización de este proyecto por no tener reparos éticos y podría ser un importante aporte al conocimiento en el área que se investiga y en el manejo de estos pacientes a futuro.


**Dr. GUILLERMO VALDEBENITO AGUILAR
PRESIDENTE CEC
SERVICIO DE SALUD COQUIMBO**

LA SERENA, 12 de Enero de 2018.

DISTRIBUCIÓN:

- Dr. Werner Apt B.
- CEC
- Secretaría

DIRECCIÓN SERVICIO DE SALUD COQUIMBO, IV REGION, AVDA. FCO. DE AGUIRRE 795, LA SERENA,

Anexo 3. Caracterización demográfica, serológica, electrocardiográfica y de co-morbilidad de 53 pacientes con enfermedad de Chagas crónica procedentes de la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo.

N	ID	Sexo	Edad	Peso	Estatura	Procedencia	Confirmación ISP ELISA e IFI IgG	Condición Trazado ECG	Co-morbilidad	Tratamiento ECh
1	5303	F	56	75.9	1.59	Rural	Positivo	Normal	HA	No
2	5309	M	59	83.8	1.68	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
3	5314	F	59	88.7	1.56	Rural	Positivo	Leve	HA, dislipidemia, hipotiroidismo	No
4	5364	F	73	55.8	1.53	Rural	Positivo	Normal	DM, hipotiroidismo	No
5	5385	F	72	53	1.5	Rural	Positivo	Leve	Dislipidemia	No
6	5392	F	60	77	1.49	Rural	Positivo	Normal	HA	No
7	5397	F	36	58.8	1.54	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
8	5410	F	55	62.7	1.51	Rural	Positivo	Normal	HA, hipercolesterolemia	No
9	5413	F	66	60.3	1.5	Rural	Positivo	Severa	Pre-diabetes, hipercolesterolemia, hipotiroidismo	No
10	5421	M	83	57	1.65	Rural	Positivo	Severa	HA	No
11	5424	M	74	64.6	1.59	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
12	5426	F	76	61	1.44	Rural	Positivo	Leve	HA, hipercolesterolemia	No
13	5427	F	56	50	1.52	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
14	5435	F	56	77	1.62	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No

N	ID	Sexo	Edad	Peso	Estatura	Procedencia	Confirmación ISP ELISA e IFI IgG	Condición Trazado ECG	Co-morbilidad	Tratamiento ECh
15	5444	F	56	72.1	1.64	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
16	5447	F	54	85.7	1.54	Rural	Positivo	Normal	HA	No
17	5464	M	61	101	1.69	Rural	Positivo	Severa	HA, hipercolesterole mia	No
18	5470	F	47	62	1.48	Rural	Positivo	Normal	HA	No
19	5472	M	69	76.5	1.72	Rural	Positivo	Normal	HA	No
20	5489	F	49	58.5	1.52	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
21	5509	F	78	64	1.57	Rural	Positivo	Normal	HA	No
22	5514	F	56	76	1.51	Rural	Positivo	Leve	HA	No
23	5515	M	58	93	1.76	Rural	Positivo	Severa	Pre-diabetes	No
24	5528	F	57	95.5	1.54	Rural	Positivo	Normal	HA, DM	No
25	5531	F	68	52	1.45	Rural	Positivo	Normal	HA, hipercolesterole mia, hipotiroidismo	No
26	5532	F	70	49.8	1.5	Rural	Positivo	Normal	hipercolesterole mia, hipotiroidismo	No
27	5536	M	58	70	1.64	Rural	Positivo	Leve	HA, pre- diabetes, hipercolesterole mia	No
28	5541	F	57	80	1.57	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
29	5543	F	77	59	1.59	Rural	Positivo	Leve	HA	No

N	ID	Sexo	Edad	Peso	Estatura	Procedencia	Confirmación ISP ELISA e IFI IgG	Condición Trazado ECG	Co-morbilidad	Tratamiento ECh
30	5544	M	86	54.4	1.63	Rural	Positivo	Severa	HA	No
31	5558	F	62	60	1.49	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
32	5569	F	63	69	1.53	Rural	Positivo	Leve	EPBO	No
33	5574	M	72	92	1.71	Rural	Positivo	Normal	Silicosis	No
34	5588	M	75	66	1,55	Rural	Positivo	Leve	HA	No
35	5590	F	83	53	1,41	Rural	Positivo	Severa	HA, DM, hipercolesterole mia	No
36	5597	F	65	63,7	1,46	Rural	Positivo	Leve	Hipercolesterole mia	No
37	5599	M	90	57,4	1,60	Rural	Positivo	Normal	HA	No
38	5601	M	67	53	1,60	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
39	5602	F	62	73,7	1,61	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No
40	5603	M	54	77	1,70	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
41	5608	F	81	62	1,48	Rural	Positivo	Leve	HA	No
42	5611	F	72	43,4	1,38	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
43	5612	M	68	82	1,70	Rural	Positivo	Leve	No presenta	No
44	5614	F	79	74	1,51	Rural	Positivo	Normal	HA, pre- diabetes	No
45	5616	F	77	62,8	1,50	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No

N	ID	Sexo	Edad	Peso	Estatura	Procedencia	Confirmación ISP ELISA e IFI IgG	Condición Trazado ECG	Co-morbilidad	Tratamiento ECh
46	5632	F	59	92	1,55	Rural	Positivo	Normal	HA	No
47	5636	M	60	74	1,74	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
48	5640	F	69	60	1,52	Rural	Positivo	Leve	Hipercolesterolemia	No
49	5646	M	71	54,8	1,59	Rural	Positivo	Normal	HA	No
50	5650	F	82	74	1,45	Rural	Positivo	Leve	HA, pre-diabetes	No
51	5651	F	59	78,7	1,52	Rural	Positivo	Leve	HA, hipercolesterolemia	No
52	5656	M	78	76,9	1,70	Rural	Positivo	Severa	No presenta	No
53	5658	M	56	87	1,65	Rural	Positivo	Normal	No presenta	No

HA: hipertensión arterial

DM: diabetes mellitus

EPBO= Enfermedad pulmonar bronco-obstructiva

Anexo 4. Pruebas estadísticas utilizadas

- a) Diferencias ADN entre concentraciones: T-test para muestras dependientes. Nivel de significancia $p < 0.05$, Corrección de Bonferroni $\alpha = 0.016$

	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv.	t	df	p
GEH	51.31485	30.80344						
GENH	64.45044	41.94003	52	-13.1356	45.87847	-2.06463	51	0.044061

	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv.	t	df	p
GEH	51.3148	30.8034						
CL	220.4315	163.1675	52	-169.117	162.2496	-7.51630	51	0.000000

	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv.	t	df	p
GENH	65.6028	42.3735						
CL	221.7894	161.8931	53	-156.187	172.4745	-6.59260	52	0.000000

b) Correlaciones entre concentraciones, Spearman's rank correlation rho

Cantidad de muestras	Tipo de muestra	rho	S	p-value
53	GEH y GENH	0,2439123	18754	0,07853
53	GEH y CL	0,2298823	19102	0,09775
53	GENH y CL	-0.0008063216	24824	0,9956

c) Pureza del ADN a 260/280 nm y 260/230 nm con Chi cuadrado

A260/280	Chi cuadrado	gl	p
Todos los grupos	21,03	4	0,0003123
GEH vs GENH	7,6	2	0.02237
GEH vs CL	11,2	2	0,003
GENH vs CL	12,35	2	0,002

A260/230	Chi cuadrado	gl	p
Todos los grupos	12,51	6	0,051

d) Cantidad de casos positivos por grupo (19 GEH, 17 GENH, 18 CL), con Chi cuadrado

N=19,17 y 18	Chi cuadrado	gl	p
Todos los grupos	0,168	2	0,92

e) Parasitemia (10 GEH, 10 GENH, 10 CL)

T-test para muestras dependientes. Nivel de significancia $p < 0.05$, Corrección de Bonferroni $\alpha = 0.0167$

	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv.	t	df	p
GEH	0.450000	0.438026						
GENH	2.421000	2.310803	10	-1.97100	2.030520	-3.06958	9	0.013363

	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv.	t	df	p
GEH	0.450000	0.438026						
CL	4.854000	6.256675	10	-4.40400	5.956843	-2.33793	9	0.044170

	Mean	Std.Dv.	N	Diff.	Std.Dv.	t	df	p
GENH	2.421000	2.310803						
CLP	4.854000	6.256675	10	-2.43300	6.118555	-1.25746	9	0.240236

f) Asociación entre Concentración ADN y carga parasitaria.

Spearman's rank correlation rho significant at $p < 0,05$.

Cantidad de muestras	Tipo de muestra	rho	s	p-value
19	GEH	-0.034407	1179.2	0.8888
17	GENH	-0.230392	1004	0.3722
18	CL	0.209494	766	0.4025

Spearman's rank correlation rho, significant at $p < 0,05$

Cantidad de muestras	Tipo de muestra	rho	S	p-value
7	GEH	0.4642857	30	0.3024
7	GENH	0.5714286	24	0,2
7	CL	0.9642857	2	0.002778

Anexo 5. Concentración de ADN (ng/μl) de muestras en GEH (grupo control), GENH (grupo I) y CL (grupo II), evaluadas mediante espectrofotometría

N°	ID	Concentración de ADN (ng/μl) GEH	DS	Concentración de ADN (ng/μl) GENH	DS	Concentración de ADN (ng/μl) CL	DS
1	5303	66,639	0,9	36,306	0,8	786,07	2,5
2	5309	41,568	0,2	34,214	0,1	59,316	ND
3	5314	77,613	12,4	31,498	0,1	470,392	ND
4	5364	103,361	0,1	31,674	0,2	311,765	ND
5	5385	29,502	3,4	28,649	0,9	45,827	7,7
6	5392	49,288	0,4	84,926	0,7	223,186	153,0
7	5397	67,790	0,7	148,246	1,4	293,786	ND
8	5410	68,291	0,9	74,66	0,1	37,424	ND
9	5413	14,975	1,4	195,868	0,8	44,293	0,88
10	5421	62,973	0,6	63,303	0,3	289,073	ND
11	5424	48,852	0,2	50,865	0,1	226,384	ND
12	5426	70,604	0,0	36,775	2,0	120,486	17,3
13	5427	58,283	0,8	24,534	0,0	73,098	ND
14	5435	41,752	0,5	130,063	2,6	375,986	ND
15	5444	70,299	0,1	162,222	1,9	94,163	ND
16	5447	27,596	0,2	71,04	1,0	109,321	ND
17	5464	66,445	0,0	40,177	0,3	28,076	0,64
18	5470	116,559	5,9	81,52	0,1	340,345	ND

19	5472	182,530	0,8	162,419	2,4	86,207	ND
20	5489	38,299	0,0	88,137	0,5	200,145	ND
21	5509	34,906	0,3	82,565	0,8	208,198	ND
22	5514	38,588	0,4	168,808	0,3	136,905	ND
23	5515	10,855	0,0	115,101	0,7	207,749	ND
24	5528	69,075	1,4	68,01	1,0	170,652	ND
25	5531	16,821	0,5	35,497	0,7	86,2	ND
26	5532	58,898	0,2	57,092	1,5	121,052	ND
27	5536	42,312	0,1	49,123	0,2	281,259	ND
28	5541	51,841	0,5	65,24	0,9	524,452	ND
29	5543	30,360	0,1	30,796	1,8	251,537	ND
30	5544	51,169	2,8	64,439	0,1	385,915	ND
31	5558	30,309	0,7	20,456	0,4	215,194	ND
32	5569	45,790	0,8	78,922	1,1	346,771	ND
33	5574	51,710	0,1	40,062	0,6	594,304	ND
34	5588	85,379	0,2	32,413	0,4	144,417	ND
35	5590	20,160	0,1	53,924	0,3	75,356	ND
36	5597	44,022	0,3	54,762	0,3	161,97	ND
37	5599	75,254	0,4	74,763	0,2	119,249	ND
38	5601	30,097	0,1	57,644	0,1	245,64	32,3
39	5602	74,503	0,5	52,747	0,4	517,418	37,2

40	5603	80,072	0,1	96,838	0,2	214,86	41,3
41	5608	26,921	0,8	19,534	0,2	159,448	ND
42	5611	80,469	1,2	58,806	0,1	323,652	ND
43	5612	55,293	0,2	64,315	0,5	49,482	11,2
44	5614	10,758	0,1	26,835	1,8	336,265	ND
45	5616	31,325	0,2	36,989	0,1	255,37	ND
46	5632	24,006	1,0	70,395	1,1	77,943	ND
47	5636	14,276	0,9	28,107	1,1	73,852	ND
48	5640	12,510	0,4	28,361	0,3	46,367	0,68
49	5646	28,301	0,9	37,523	0,0	24,11	1,5
50	5650	71,697	0,7	54,431	0,0	150,198	ND
51	5651	55,696	0,0	30,178	0,5	281,888	ND
52	5656	11,780	0,5	19,65	0,2	459,421	ND
53	5658	59,930	0,0	125,524	0,9	292,403	ND
Promedio		51,5	-	65,6	-	221,8	-
Mediana		49,3	-	54,8	-	207,7	-
DS		± 30,5	-	± 42,0	-	± 160,4	-

Anexo 6.

a) Índices de pureza del ADN a A260/280 en muestras en GEH (grupo control), GENH (grupo I) y CL (grupo II)

N°	ID	Índice pureza 260/280 GEH	DS	Índice pureza 260/280 GENH	DS	Índice pureza 260/280 CL	DS
1	5303	2,0	0,1	2,3	0,0	1,9	0,0
2	5309	1,9	0,0	2,1	0,2	1,9	ND
3	5314	2,0	0,0	1,7	0,0	1,9	ND
4	5364	2,1	0,0	1,9	0,1	1,9	ND
5	5385	1,8	0,4	1,6	0,1	1,9	0,1
6	5392	1,7	0,2	1,9	0,0	1,8	0,2
7	5397	2,0	0,1	2,0	0,0	1,9	ND
8	5410	2,0	0,0	2,0	0,0	1,8	ND
9	5413	2,7	0,0	1,9	0,0	1,9	0,0
10	5421	2,1	0,3	2,0	0,1	1,9	ND
11	5424	2,1	0,0	1,9	0,0	1,9	ND
12	5426	2,0	0,1	1,7	0,1	1,9	0,0
13	5427	2,0	0,1	1,9	0,1	2,0	ND
14	5435	2,0	0,1	1,9	0,0	1,9	ND
15	5444	2,0	0,1	2,0	0,0	1,9	ND
16	5447	1,9	0,4	1,9	0,1	1,7	ND
17	5464	2,2	0,1	2,0	0,2	1,9	0,2

18	5470	2,2	0,2	2,0	0,1	1,9	ND
19	5472	2,1	0,0	1,9	0,1	1,7	ND
20	5489	2,3	0,1	1,9	0,1	1,8	ND
21	5509	2,1	0,1	2,0	0,0	1,9	ND
22	5514	2,1	0,3	2,0	0,1	1,9	ND
23	5515	2,4	0,8	2,1	0,0	1,8	ND
24	5528	2,1	0,1	2,0	0,0	1,8	ND
25	5531	2,4	0,2	2,1	0,2	1,9	ND
26	5532	2,1	0,1	2,0	0,1	1,9	ND
27	5536	2,0	0,2	2,3	0,3	1,8	ND
28	5541	2,2	0,0	2,0	0,1	1,9	ND
29	5543	2,0	0,0	2,3	0,0	1,9	ND
30	5544	2,1	0,2	2,1	0,1	1,9	ND
31	5558	1,9	0,0	1,6	0,1	1,8	ND
32	5569	2,1	0,2	2,0	0,0	1,9	ND
33	5574	2,0	0,2	2,3	0,1	1,9	ND
34	5588	2,0	0,0	2,2	0,1	2,0	ND
35	5590	2,1	0,4	2,0	0,1	1,8	ND
36	5597	1,9	0,2	2,1	0,1	1,9	ND
37	5599	1,9	0,1	1,9	0,1	2,0	ND
38	5601	1,8	0,1	1,8	0,1	1,9	0,0

39	5602	2,1	0,0	1,9	0,0	1,8	0
40	5603	2,1	0,1	2,0	0,1	1,9	0,1
41	5608	2,1	0,2	1,6	0,1	1,9	ND
42	5611	1,9	0,1	1,8	0,0	1,9	ND
43	5612	1,9	0,1	1,9	0,0	1,8	0,0
44	5614	2,2	0,5	1,6	0,0	1,9	ND
45	5616	1,8	0,0	2,0	0,1	1,9	ND
46	5632	2,0	0,0	1,9	0,0	1,8	ND
47	5636	3,8	1,4	1,6	0,1	1,8	ND
48	5640	2,0	0,5	1,7	0,0	1,8	0,1
49	5646	1,9	0,1	1,7	0,1	1,9	0,2
50	5650	2,0	0,1	2,0	0,0	1,9	ND
51	5651	2,0	0,2	2,3	0,1	1,9	ND
52	5656	2,8	0,4	1,8	0,2	1,9	ND
53	5658	2,0	0,0	2,0	0,0	1,9	ND

b) Índices de pureza del ADN a A260/230 en muestras en GEH (grupo control), GENH (grupo I) y CL (grupo II)

N°	ID	Índice pureza 260/230 GEH	DS	Índice pureza 260/230 GENH	DS	Índice pureza 260/230 CL	DS
1	5303	2,5	0,0	2,9	0,1	2,3	0,0
2	5309	1,8	1,3	1,7	0,0	1,9	ND
3	5314	1,9	0,1	1,7	0,0	2,3	ND

4	5364	2,5	0,1	1,7	0,1	1,8	ND
5	5385	3,2	1,3	1,1	0,1	1,7	0,4
6	5392	0,3	0,0	2,0	0,0	1,7	0,2
7	5397	2,1	0,0	2,5	0,0	2,1	ND
8	5410	2,6	0,0	2,0	0,0	2,2	ND
9	5413	1,6	0,2	2,3	0,0	2,2	0,1
10	5421	2,8	0,0	2,0	0,0	2,2	ND
11	5424	3,0	0,1	2,1	0,1	2,1	ND
12	5426	1,2	0,0	1,1	0,0	2,1	0,0
13	5427	2,8	0,0	0,7	0,0	2,2	ND
14	5435	2,0	0,1	1,7	0,1	2,3	ND
15	5444	2,7	0,0	2,4	0,0	1,7	ND
16	5447	1,7	0,0	2,3	0,0	2,1	ND
17	5464	2,4	0,0	1,9	0,0	1,8	0,0
18	5470	2,4	0,2	2,2	0,0	2,2	ND
19	5472	2,4	0,0	2,4	0,0	1,7	ND
20	5489	2,6	0,0	2,2	0,1	1,5	ND
21	5509	2,0	0,0	2,4	0,1	2,0	ND
22	5514	2,9	0,1	2,4	0,0	1,9	ND
23	5515	1,5	0,0	2,4	0,0	1,9	ND
24	5528	2,1	0,0	2,5	0,0	1,6	ND

25	5531	2,3	0,0	2,2	0,0	1,9	ND
26	5532	1,6	0,0	2,0	0,0	1,6	ND
27	5536	2,9	0,0	2,9	0,2	1,9	ND
28	5541	2,8	0,1	2,5	0,1	2,4	ND
29	5543	1,8	0,1	2,0	0,2	2,4	ND
30	5544	2,4	0,3	2,7	0,0	2,4	ND
31	5558	1,7	0,0	1,4	0,0	1,9	ND
32	5569	2,6	0,0	2,5	0,0	2,0	ND
33	5574	2,2	0,0	2,2	0,1	2,4	ND
34	5588	2,1	0,0	2,4	0,1	2,1	ND
35	5590	2,0	0,0	2,5	0,0	1,8	ND
36	5597	2,2	0,0	2,7	0,0	2,3	ND
37	5599	2,1	0,0	2,0	0,0	2,3	ND
38	5601	2,1	0,0	1,8	0,0	1,6	0,1
39	5602	2,3	0,0	1,8	0,0	1,7	0,3
40	5603	2,1	0,0	2,4	0,1	1,8	0,2
41	5608	2,1	0,0	1,1	0,0	2,2	ND
42	5611	2,2	0,0	2,0	0,0	2,3	ND
43	5612	1,9	0,0	2,0	0,1	1,5	0,2
44	5614	1,6	0,1	1,6	0,0	2,1	ND
45	5616	1,4	0,0	2,5	0,1	2,3	ND

46	5632	1,9	0,0	2,0	0,0	1,8	ND
47	5636	1,8	0,0	1,6	0,0	2,3	ND
48	5640	1,4	0,1	1,2	0,0	2,0	0,0
49	5646	2,0	0,1	1,8	0,0	1,8	0,1
50	5650	2,6	0,1	2,6	0,0	2,3	ND
51	5651	2,1	0,2	1,9	0,1	2,1	ND
52	5656	1,6	0,1	0,7	0,0	1,9	ND
53	5658	1,9	0,0	2,3	0,0	2,3	ND

Anexo 7. Ct (Cycle threshold) obtenidos para el control de reacción IPC (TaqMan® Exogenous Internal Positive Control, Applied Biosystems)

N°	ID	GEH (grupo control)		GENH (grupo I)		CL (grupo II)	
		CT	IPC	CT	IPC	CT	IPC
1	5303	28,35	Positivo	28,3	Positivo	27,98	Positivo
2	5309	28,34	Positivo	28,53	Positivo	28,68	Positivo
3	5314	27,81	Positivo	28,67	Positivo	28,24	Positivo
4	5364	28,30	Positivo	25,69	Positivo	28,69	Positivo
5	5385	27,90	Positivo	28,26	Positivo	28,53	Positivo
6	5392	28,45	Positivo	28,47	Positivo	28,64	Positivo
7	5397	28,08	Positivo	28,59	Positivo	28,70	Positivo
8	5410	28,55	Positivo	28,63	Positivo	28,69	Positivo
9	5413	28,04	Positivo	28,44	Positivo	28,71	Positivo

10	5421	27,82	Positivo	28,67	Positivo	28,08	Positivo
11	5424	27,90	Positivo	28,63	Positivo	28,54	Positivo
12	5426	27,80	Positivo	28,84	Positivo	28,59	Positivo
13	5427	27,97	Positivo	28,33	Positivo	28,19	Positivo
14	5435	28,59	Positivo	28,83	Positivo	28,36	Positivo
15	5444	28,06	Positivo	28,72	Positivo	28,35	Positivo
16	5447	28,22	Positivo	28,77	Positivo	28,56	Positivo
17	5464	28,62	Positivo	28,15	Positivo	28,74	Positivo
18	5470	28,42	Positivo	25,63	Positivo	28,52	Positivo
19	5472	28,51	Positivo	28,71	Positivo	28,07	Positivo
20	5489	28,40	Positivo	28,47	Positivo	28,29	Positivo
21	5509	28,42	Positivo	28,64	Positivo	28,19	Positivo
22	5514	28,64	Positivo	28,54	Positivo	28,33	Positivo
23	5515	28,38	Positivo	28,64	Positivo	28,14	Positivo
24	5528	28,37	Positivo	25,49	Positivo	28,18	Positivo
25	5531	28,45	Positivo	28,58	Positivo	28,04	Positivo
26	5532	28,40	Positivo	25,46	Positivo	28,27	Positivo
27	5536	28,21	Positivo	25,09	Positivo	28,33	Positivo
28	5541	27,71	Positivo	28,69	Positivo	28,50	Positivo
29	5543	28,21	Positivo	24,64	Positivo	28,88	Positivo
30	5544	27,71	Positivo	25,80	Positivo	28,56	Positivo

31	5558	27,92	Positivo	25,97	Positivo	28,56	Positivo
32	5569	28,02	Positivo	28,63	Positivo	28,68	Positivo
33	5574	28,43	Positivo	25,51	Positivo	28,91	Positivo
34	5588	27,86	Positivo	25,92	Positivo	28,49	Positivo
35	5590	27,74	Positivo	25,91	Positivo	28,56	Positivo
36	5597	27,84	Positivo	25,23	Positivo	28,39	Positivo
37	5599	28,11	Positivo	25,70	Positivo	28,85	Positivo
38	5601	27,88	Positivo	25,74	Positivo	28,61	Positivo
39	5602	27,75	Positivo	28,90	Positivo	28,23	Positivo
40	5603	28,20	Positivo	25,71	Positivo	28,25	Positivo
41	5608	27,97	Positivo	28,75	Positivo	28,21	Positivo
42	5611	27,98	Positivo	25,86	Positivo	28,13	Positivo
43	5612	27,92	Positivo	28,57	Positivo	28,37	Positivo
44	5614	27,93	Positivo	26,05	Positivo	28,07	Positivo
45	5616	27,92	Positivo	26,03	Positivo	28,03	Positivo
46	5632	27,90	Positivo	28,67	Positivo	28,17	Positivo
47	5636	27,67	Positivo	28,87	Positivo	28,22	Positivo
48	5640	28,08	Positivo	28,79	Positivo	28,23	Positivo
49	5646	27,72	Positivo	28,76	Positivo	28,16	Positivo
50	5650	27,93	Positivo	28,65	Positivo	28,15	Positivo
51	5651	27,97	Positivo	26,16	Positivo	28,22	Positivo

52	5656	27,94	Positivo	24,96	Positivo	28,17	Positivo
53	5658	27,85	Positivo	25,69	Positivo	28,15	Positivo

Anexo 8. Características de la población con parasitemia positiva

N	ID	Sexo	Edad	Condición Trazado ECG	Co-morbilidad	Grupo prioritario a tratamiento de ECh
1	5303	F	56	Normal	HA	Si
2	5385	F	72	Leve	Dislipidemia	No
3	5392	F	60	Normal	HA	Tal vez
4	5397	F	36	Normal	No presenta	Si
5	5410	F	55	Normal	HA, hipercolesterolemia	Si
6	5413	F	66	Severa	Pre-diabetes, hipercolesterolemia, hipotiroidismo	No
7	5421	M	83	Severa	HA	No
8	5427	F	56	Severa	No presenta	No
9	5472	M	69	Normal	HA	No
10	5489	F	49	Normal	No presenta	Si
11	5509	F	78	Normal	HA	No
12	5515	M	58	Severa	Pre-diabetes	No
13	5531	F	68	Normal	HA, hipercolesterolemia, hipotiroidismo	No

14	5536	M	58	Leve	HA, pre-diabetes, hipercolesterolemia	Si
15	5541	F	57	Normal	No presenta	Si
16	5544	M	86	Severa	HA	No
17	5558	F	62	Normal	No presenta	No
18	5569	F	63	Leve	EPBO	No
19	5588	M	75	Leve	HA	No
20	5590	F	83	Severa	HA, DM, hipercolesterolemia	No
21	5602	F	62	Normal	No presenta	No
22	5603	M	54	Severa	No presenta	No
23	5611	F	72	Severa	No presenta	No
24	5612	M	68	Leve	No presenta	No
25	5632	F	59	Normal	HA	Si
26	5658	M	56	Normal	No presenta	Si

HA=Hipertensión arterial

DM= Diabetes mellitus

EPBO= Enfermedad pulmonar bronco-obstructiva

Anexo 9. Parasitemia obtenida en los 10 casos detectados en los tres tipos de muestras.

N= 10	ID	GEH	GENH	CL
1	5303	0,62	1,18	18,43
2	5421	1,15	7,55	9,00
3	5509	0,15	2,59	1,19
4	5515	0,08	0,39	0,86
5	5536	0,42	4,72	2,09
6	5541	1,29	3,49	12,17
7	5588	0,25	0,65	0,43
8	5590	0,21	2,36	0,94
9	5611	0,08	0,37	3,40
10	5632	0,25	0,91	0,03
PROMEDIO		0,45	2,42	4,85
DS		± 0,44	± 2,31	± 6,26
MEDIANA		0,25	1,77	1,64