

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico-Molecular, Hematología y Medicina Transfusional

“Caracterización serológica, parasitológica y clínica de individuos con enfermedad de Chagas en la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, Chile.”

Alumno: Andrés Eduardo Guevara Marín

Tutora: Inés Zulantay Alfaro, PhD

Asesor Estadístico: Mauricio Canals Lambarri, PhD

Firma manuscrita en tinta azul de Inés Zulantay.

Firma Tutora

Fecha: 21 Julio 2022

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Bioanálisis Clínico-Molecular, Hematología y Medicina Transfusional

“Caracterización serológica, parasitológica y clínica de individuos con enfermedad de Chagas en la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, Chile.”

Alumno: Andrés Eduardo Guevara Marín

Tutora: Inés Zulantay Alfaro, PhD

Asesor Estadístico: Mauricio Canals Lambarri, PhD

Firma manuscrita en tinta azul de Inés Zulantay Alfaro, sobre una línea horizontal negra.

Firma Tutora

Fecha: 21 Julio 2022

Dedicatoria

En primer lugar, quisiera partir agradeciendo a toda mi familia por el constante apoyo y amor que me han estado dando desde siempre. Dedico mi tesis especialmente con mucho cariño a mis padres, que por años se han partido la espalda para darnos a mi hermana y a mí una vida tranquila y libre de preocupaciones; sin ustedes definitivamente yo no estaría aquí. El trabajo y esfuerzo que he puesto hasta ahora está principalmente dedicado a ustedes, quienes me han dado la fortaleza necesaria para soportar mi paso por este valle de lágrimas llamado Tecnología Médica. Quiero dedicar esta tesis también a todas las personas que me siento afortunado de poder llamar amigos. Tanto a los amigos que tengo desde tiempos inmemoriales, como a los que fui conociendo recientemente, quiero darles las gracias por dejarme ser parte de sus vidas y por todas las risas y lágrimas compartidas.

Ha sido viaje largo, un camino lleno de altos y bajos, pero que con la entrega de esta tesis ya está por terminar. Quedándome tan poco para concluir mi vida universitaria, solo puedo pararme a pensar en todas las preciadas personas que han estado a mi lado y en querer decirles: “gracias por darme este dulce sueño”.

Andrés Guevara Marín

Agradecimientos

Quiero agradecer a todo el equipo que conforma y conformaba el Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico, pues los distintos integrantes del equipo hicieron que me sintiera muy acogido y a gusto trabajando a su lado. Agradezco especialmente a mi tutora, la Prof. Inés Zulantay, por recibirme cuando me encontraba buscando una tesis y por guiarme a lo largo de este proceso. Agradezco infinitamente toda la ayuda que me dio y todas las cosas que me enseñó en mi paso por el laboratorio.

También a la Sra. Rosa Ávila, secretaria del laboratorio, por todo el trabajo que hizo para facilitar mis propias labores y por animarme todos los días con las conversaciones del almuerzo.

A la TM Daniela Liempi, por todo lo enseñado y por todo el apoyo que me dio desde que llegué al laboratorio. A mi compañero Nicolás Poulsen, por la inmensa ayuda prestada durante el desarrollo de mi tesis y por todos los gratos momentos que compartimos mientras trabajamos.

Agradezco además a los más de quinientos pacientes que accedieron a participar del estudio, contribuyendo así al conocimiento epidemiológico que se tiene de la Enfermedad de Chagas en nuestro país. Al Dr. Gonzalo Cabrera, por facilitarnos las cepas de *Trypanosoma cruzi* que necesitábamos para implementar la técnica de PCR en tiempo real. También al Dr. Marcelo Llancaqueo, por interpretar e informar los resultados de los electrocardiogramas de doce derivaciones. Y al Dr. Marcelo Canals por ayudarnos con el análisis estadístico de los datos obtenidos.

Finalmente, agradezco al Proyecto Fonis-Fondef-Conicyt EULAC Health TO20108 por brindar el financiamiento que fue necesario para el desarrollo de mi tesis.

Índice

1.	Resumen	5
2.	Introducción	6
2.1.	Manifestaciones clínicas	6
2.2.	Tratamiento.....	7
2.3.	Epidemiología	9
3.	Hipótesis	10
4.	Objetivos	11
4.1.	Objetivos generales	11
4.2.	Objetivos específicos	11
5.	Materiales y métodos	12
5.1.	Reclutamiento de individuos para tamizaje	12
5.2.	Caracterización serológica	12
5.3.	Caracterización parasitológica con qPCR	14
5.4.	Caracterización clínica	18
5.5.	Evaluación de criterios inclusión y/o exclusión a tratamiento etiológico	18
5.6.	Análisis estadístico	18
6.	Resultados	19
6.1.	Reclutamiento de individuos participantes	19
6.2.	Caracterización serológica	19
6.3.	Caracterización parasitológica	22
6.4.	Caracterización clínica	24
6.5.	Posibilidad de acceso a tratamiento	25
7.	Discusión	28
8.	Conclusiones	32
9.	Referencias bibliográficas	35
10.	Anexos	39

1. Resumen

La enfermedad de Chagas (ECh) es una infección parasitaria cuyo tratamiento tiene eficacia comprobada pero, a pesar de esto, la cantidad de personas que logran acceder al tratamiento es baja. En esta investigación, se caracterizó serológica, parasitológica y clínicamente a individuos con ECh no tratada procedentes de la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, y se evaluó si estos individuos cumplen con algunos de los criterios de inclusión para el tratamiento, de acuerdo a las normas ministeriales vigentes. Para realizar caracterización serológica, se hizo tamizaje con ELISA IgG para posteriormente derivar las muestras a confirmación al Laboratorio de Referencia del ISP, y se titularon los anticuerpos anti *T. cruzi* en los individuos confirmados no tratados con la técnica de IFI IgG. En la caracterización parasitológica se utilizó la técnica de qPCR para determinar la carga parasitaria de los individuos con parasitemia positiva. En cuanto a la caracterización clínica, a los individuos estudiados se les realizó estudio electrocardiográfico y se les encuestó por presencia de comorbilidades. Finalmente, se evaluó si los individuos cumplen con criterios de exclusión e inclusión para el tratamiento antiparasitario.

En el 16,7% de los individuos se confirmó la infección, y entre estos, el título de anticuerpos más frecuente fue 320. 20 individuos presentan ADN de *T. cruzi* detectable en sangre, con una carga parasitaria media de 1,86 parásitos-eq/mL. 52,8% de los individuos presentan alteraciones electrocardiográficas y 34,2% no tienen comorbilidades. Finalmente, se observó que, en base a los criterios establecidos en la normativa ministerial, el 75% de los individuos pueden acceder al tratamiento, pero de este porcentaje, solo el 70,2% forma parte de los grupos prioritarios de acceso a este. Debido a lo anterior, es necesario que se realice una revisión de los criterios para asegurar que más personas puedan ser tratadas contra la ECh.

2. Introducción

La enfermedad de Chagas (ECh) es una infección parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, agente que parasita el tracto digestivo de triatomíneos, y la sangre y tejidos de diversas especies de mamíferos, incluidos los humanos¹. La transmisión de esta infección puede ocurrir a través de diversos mecanismos, los que corresponden a la transmisión vectorial, en la cual el principal vector es *Triatoma infestans*; transfusional, oral, por alimentos contaminados; transplacentaria, accidentes de laboratorio y trasplantes de órganos².

2.1. Manifestaciones clínicas

En humanos, la evolución de esta enfermedad se caracteriza por dividirse en dos grandes fases clínicas, una aguda y una crónica, la que a su vez puede subdividirse en indeterminada y determinada. La primera fase de la ECh es la aguda, que se inicia con la entrada del parásito al hospedero y dura de 4 a 8 semanas. Esta se caracteriza por ser usualmente asintomática, aunque pueden presentarse algunos síntomas³. En esta fase de la enfermedad, la muerte puede ocurrir ocasionalmente en 5-10 % de los casos sintomáticos, y es resultado de miocarditis y/o meningoencefalitis severa⁴.

Como se mencionó anteriormente, la fase crónica de la ECh se puede dividir en una forma indeterminada y en una determinada. La primera de estas se define como la ausencia prolongada de manifestaciones clínicas, electrocardiográficas o radiológicas significativas, y además se caracteriza por la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en el suero de los pacientes⁵. De los pacientes que se encuentran en esta fase de la enfermedad, aproximadamente el 20-30% de ellos progresa a la forma determinada⁶. La presentación clínica de esta fase está dada por el compromiso de órganos como el corazón, colon y esófago, siendo el compromiso cardíaco la característica más importante de esta fase debido a su frecuencia y severidad⁷. Cuando se estudia

el compromiso cardíaco por medio de electrocardiograma, no es posible evidenciar un patrón patognomónico, sin embargo este examen permite buscar dirigida información de utilidad en el manejo de la enfermedad⁸. Por otra parte, si bien el daño en corazón, colón y esófago es lo más habitual, también es posible encontrar compromiso en otros órganos como estómago, duodeno, vejiga y uréteres, aunque infrecuentemente⁹.

2.2. Tratamiento

Para tratar la ECh solo se encuentran disponibles dos fármacos de eficacia probada, los cuales son Nifurtimox y Benznidazol. El tratamiento con estos fármacos durante la fase aguda de la enfermedad es siempre recomendada, salvo algunas excepciones, al igual que en las reactivaciones en pacientes inmunocomprometidos. Se ha evidenciado además que el tratamiento con estos fármacos posee una alta eficacia en la ECh congénita en pacientes tratados en el primer año de vida¹⁰.

El que los pacientes con la ECh crónica puedan ser tratados también es fundamental, pues se ha demostrado que aquellos individuos que reciben el tratamiento muestran una menor progresión hacia la cardiopatía crónica en comparación a aquellos que no son tratados¹¹. Sin embargo, a pesar de los beneficios que tiene el tratamiento para la salud de los pacientes, no muchos de estos lo completan. Por una parte, esto se debe a que los fármacos usados generan reacciones adversas en los pacientes, lo que tiene como consecuencia una alta tasa de interrupción del tratamiento; mientras que por otra parte existe poca consciencia sobre la enfermedad y un limitado acceso a los medicamentos^{12, 13}.

En Chile, se ha establecido que los casos en que existe prioridad para recibir el tratamiento antiparasitario corresponden a: 1) personas que cursan la fase aguda de la enfermedad, independiente del mecanismo de transmisión, 2) personas inmunodeprimidas o candidatas a inmunosupresión; 3) menores de 18 años, 4) recién nacidos con ECh congénita y 5) mujeres en

edad fértil de hasta 45 años, que no se encuentran embarazadas ni en periodo de lactancia; 6) pacientes jóvenes y adultos hasta los 60 años, con serología positiva en fase crónica indeterminada; y 7) accidentes de laboratorio o quirúrgico con objetos corto punzantes infectados. Pero además de esto, la normativa chilena establece criterios de exclusión estrictos que determinan qué pacientes se encuentran contraindicados para recibir el tratamiento, clasificando las causas de contraindicación en Absolutas y Relativas (Tabla 1)⁸. Las primeras corresponden a condiciones incompatibles con la terapia debido a la posibilidad de riesgo vital, mientras que las últimas son aquellas contraindicaciones que no implican este riesgo y que de acuerdo a una evaluación médica se podría iniciar el tratamiento¹⁴.

Tabla 1: Lista de contraindicaciones Absolutas y Relativas⁸.

Contraindicaciones Absolutas	Contraindicaciones Relativas
Mujeres embarazadas	Personas en quienes no pueda asegurarse el control sistemático del tratamiento
Mujeres en periodo de lactancia	Pacientes operados por ECh digestiva y con marcapasos
Hipersensibilidad conocida al fármaco antiparasitario	Pacientes con enfermedades mentales graves
Personas con enfermedades: <ul style="list-style-type: none"> ● Hematológicas ● Daño crónico renal, hepático o pulmonar ● Cardiopatía chagásica crónica (CCC) grave. Sin embargo, frente a alteraciones iniciales del sistema eléctrico conductor, sin daño cardíaco importante puede considerarse la terapia. ● Alcoholismo inveterado ● Adicciones a drogas ● Megaformaciones importantes 	Sospecha de baja adhesión

Todo lo mencionado anteriormente, sumado al déficit existente en el acceso al tratamiento, tiene como consecuencia que de todos los pacientes que padecen la ECh, una cantidad importante de estos no podrán ser tratados¹³.

2.3. Epidemiología

Esta parasitosis se caracteriza por ser endémica de Latinoamérica, y particularmente de las áreas rurales; sin embargo, debido a los movimientos migratorios y al turismo, la ECh se ha convertido en una enfermedad emergente y un problema de salud pública en los países no endémicos, en gran medida por los mecanismos de transmisión no vectorial¹⁵. Estos mecanismos, especialmente la transmisión transfusional y la vertical, son los más frecuentes en zonas urbanizadas y en países no endémicos⁴. En el caso de Chile, esto cobra particular relevancia considerando el hecho de que en el país se ha declarado interrumpida la transmisión vectorial¹⁶. Es debido a esto, que la prevención de la transmisión transfusional y vertical se convierte en una estrategia importante para poder alcanzar el objetivo de disminuir cada vez más la prevalencia de la ECh en Chile.

En cuanto a las tasas de mortalidad de esta enfermedad, estas muestran variabilidad dentro de Chile, con un claro predominio en zonas de alta endemia. En un estudio publicado en 2020 por Salas P., se evidenció que la Región de Coquimbo es la que cuenta con la mayor tasa de mortalidad a nivel nacional, ocurriendo en esta región el 49,37% de las muertes por Chagas del país¹⁷. En este mismo estudio se demostró además que dentro de esta Región es posible observar que las comunas que presentan las tasas de mortalidad más altas corresponden a las comunas de Salamanca, Illapel y Combarbalá. En esta última comuna, cuya población según el censo de 2017 es de 13.322 habitantes, el 55% de estos vive en zonas rurales¹⁸. Otro dato relevante obtenido en este censo es que solo un 47% de las viviendas cuentan con un índice de materialidad aceptable, lo que implica que más de la mitad de las viviendas de la comuna son

deficientes estructuralmente, ya sea por contar con muros de adobe o pisos de tierra. Estas características corresponden a factores de riesgo para la transmisión vectorial de la infección, la cual como se dijo anteriormente ha sido interrumpida en Chile. Sin embargo, es muy probable que estas mismas condiciones puedan haber estado presentes antes de que ocurriera la interrupción de la transmisión vectorial, lo que implicaría que una gran parte de los habitantes de la comuna puede haber estado expuestos a la infección por *T. cruzi*.

Teniendo en consideración los problemas de acceso al tratamiento que existen, es posible pensar que un gran número de personas infectadas en la comuna de Combarbalá no han sido tratadas. Por esto mismo, se genera la interrogante de si estos individuos presentan un alto avance de la enfermedad, y si estos podrían ser tratados considerando la normativa ministerial.

3. Hipótesis

En áreas rurales y urbanas de la Comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, considerada de alta endemia de Chagas, existen individuos infectados que no han accedido a tratamiento etiológico, presentan alteraciones electrocardiográficas de diversa magnitud y presentan parasitemia detectable en su sangre periférica a través de PCR en tiempo real cuantitativo. Además, un porcentaje importante de estos infectados caracterizados, no tendrán acceso al tratamiento de acuerdo a los criterios de inclusión de la normativa ministerial vigente.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General: Caracterizar serológica, electrocardiográfica y parasitológicamente a individuos con Chagas no tratada procedentes de áreas urbanas y rurales de la comuna de Combarbalá, Chile; y evaluar algunos criterios de inclusión para el tratamiento de acuerdo a las normas ministeriales vigentes.

4.2. Objetivos Específicos:

1. Investigar serológicamente la infección por *Trypanosoma cruzi* en individuos procedentes de población urbana y rural de la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, Chile.
2. Evaluar la condición electrocardiográfica en los infectados con Chagas confirmada no tratada.
3. Evaluar parasitemia en los infectados con Chagas confirmada no tratada.
4. Evaluar el número de infectados que podrían acceder a tratamiento etiológico de acuerdo a los criterios de la normativa ministerial disponibles en este estudio.

5. Materiales y métodos

5.1. Reclutamiento de individuos para tamizaje

Bajo consentimiento informado (Anexo I), se invitó a participar a individuos de áreas urbanas y rurales de la comuna de Combarbalá, Región de Coquimbo, Chile; considerando como único criterio de inclusión el residir en la comuna ya mencionada. A cada participante se le extrajeron tres muestras de sangre periférica, siendo recolectadas en un tubo sin aditivos, en uno con EDTA y en uno con Guanidina-HCl/EDTA. Al momento de la toma de muestra se recopilaron datos demográficos de los participantes reclutados, como sexo y edad; antecedentes de diagnóstico de la infección por *T. cruzi* y antecedentes de tratamiento etiológico para esta. Posteriormente los participantes fueron sometidos a una prueba de tamizaje para la enfermedad de Chagas mediante serología convencional.

5.2. Caracterización serológica

Para el tamizaje serológico de los individuos, en primer lugar se realizó un test de ELISA para la identificación cualitativa de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en suero a todos los individuos reclutados. Posteriormente, todos los casos positivos e indeterminados fueron enviados al Laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública (ISP) para su confirmación¹⁴. Tras esto último, se prosiguió el estudio solo con los individuos positivos confirmados por el ISP y que no habían recibido tratamiento etiológico para la infección.

Una vez seleccionados los individuos para el estudio, con el suero de estos se realizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para identificar y titular anticuerpos IgG contra *T. cruzi* (técnica *in house*)¹⁹.

5.2.1. ELISA IgG

Los test de ELISA fueron hechos con el kit comercial Test ELISA Chagas III (GrupoBios S.A.) para identificar de forma cualitativa anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en el suero de los individuos participantes. Además de los controles del kit, en cada corrida también se utilizaron controles externos proporcionados por el Laboratorio Clínico Hospital Barros Luco Trudeau (laboratorio reconocido por el ISP para confirmación de la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi*), los que fueron procesados en duplicado. El procedimiento realizado para esta técnica se encuentra en el Anexo II. En los casos en que se obtuvieron resultados indeterminados se volvió a realizar la determinación en duplicado.

5.2.2. Confirmación de casos

Tras la obtención de los resultados en la prueba anterior, los casos positivos e indeterminados fueron derivados al Laboratorio de Referencia del ISP para su confirmación. Los resultados definitivos fueron entregados a cada uno de los individuos con copia a las autoridades de salud respectivas (Departamento de Salud de la Municipalidad de Combarbalá y Hospital de Combarbalá).

5.2.3. Inmunofluorescencia indirecta IgG

Con el suero de los individuos que obtuvieron resultados positivos confirmados por el Laboratorio de Referencia del ISP, y que además no habían sido tratados, se aplicó un ensayo de Inmunofluorescencia Indirecta. Con esta técnica se titularon los anticuerpos IgG anti *T. cruzi* de los individuos en estudio, y se consideró un título ≥ 20 como un resultado positivo, de acuerdo a las recomendaciones del ISP²⁰. El procedimiento realizado para este examen corresponde al mencionado en el Anexo III.

En el desarrollo de esta técnica se utilizó como control positivo un suero con título de 40 que fue proporcionado por la Dra. Lineth García (Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia), y se realizaron diluciones seriadas de los sueros control y de los sueros a investigar, obteniéndose las siguientes diluciones 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280. Los sueros fueron diluidos con buffer fosfato salino pH 7,2. En aquellos casos en que el título obtenido fue 1280 se repitió la IFI con diluciones mayores, para confirmar que el título efectivamente era de 1280 y no uno más alto.

5.3. Caracterización parasitológica con qPCR

5.3.1. Extracción de ADN:

Las muestras utilizadas para la caracterización parasitológica de los individuos en estudio corresponden a sangre total con guanidina-HCl/EDTA no hervida. Por otra parte, para confeccionar la curva de calibración se utilizaron cultivos de epimastigotes de las cepas de *T. cruzi* Dm28c e Y, las que fueron proporcionadas por el Dr. Gonzalo Cabrera (Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad de Chile).

La extracción de ADN, tanto de las muestras como de las cepas del parásito, se realizó utilizando el kit comercial E.Z.N.A.® Blood DNA Mini Kit (Omega Bio-tek) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El procedimiento usado se encuentra detallado en el Anexo IV.

5.3.2. Estandarización de la qPCR:

La confección de la curva de calibración fue realizada tomando en consideración la estimación de que 1.000.000 de parásitos/mL corresponden a una concentración de 0,2 ng/μL de ADN²¹. Se cuantificó la concentración del ADN extraído desde los cultivos con el kit Qubit® ds DNA HS Assay Kit en un fluorómetro Qubit® 3 (Thermofisher). El protocolo detallado de la cuantificación se encuentra descrito en el Anexo V. Una vez hecha la cuantificación del ADN extraído desde los cultivos, se prepararon soluciones de cada cepa con una concentración de 0,4

ng/ μ L de ADN, usándose como diluyente el Buffer de Elución del kit de extracción. Luego de lo anterior, se mezclaron ambas soluciones en una relación 1:1, tras lo que se cuantificó la concentración de ADN en la mezcla de ambas cepas para confirmar que esta contaba con el valor requerido de 0,4 ng/ μ L (2×10^6 parásitos-eq/mL). La mezcla fue posteriormente diluída 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.

Los siete puntos de la curva fueron preparados haciendo diluciones seriadas en un factor de 10, utilizando como diluyente 90 μ L de un pool de ADN de individuos con serología negativa para ECh, extraído desde sangre con guanidina-HCl/EDTA no hervida. Como solución inicial se usó la mezcla de ADN de ambas cepas mencionadas anteriormente, tomándose 10 μ L de esta para completar un volumen final de 100 μ L en cada tubo. Las concentraciones de ADN parasitario y su equivalencia en parásitos/mL para cada punto de la curva se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2: Equivalencia de parásitos-eq/mL a ng/ μ L de ADN en puntos de la curva de calibración.

Tubo	Parásitos-eq/mL	ADN parásito (ng/ μ L)
1	100.000	2×10^{-2}
2	10.000	2×10^{-3}
3	1.000	2×10^{-4}
4	100	2×10^{-5}
5	10	2×10^{-6}
6	1	2×10^{-7}
7	0,1	2×10^{-8}

5.3.3. Sistema de detección con PCR en tiempo real cuantitativo

TaqMan®:

La carga parasitaria fue determinada con los partidores Cruzi 1 y Cruzi 2, utilizando además la sonda Cruzi 3 (Applied Biosystem), cuyos rendimientos ya han sido probados previamente (Tabla 3)²². Este ensayo corresponde a una reacción “múltiplex”, pues no solo se buscó amplificar la secuencia blanco de *T. cruzi*, sino que también se amplificó el control de amplificación interno, el cual corresponde al kit comercial TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents (IPC) (Applied Biosystems). Adicionalmente a este control de amplificación, se utilizaron como controles positivos los puntos 4 y 5 de la curva de calibración (ver Tabla 2). Para los controles negativos, se utilizaron tres muestras de individuos con serología negativa, y para el control de manipulación se usó agua libre de nucleasas. En el desarrollo de esta metodología, los puntos de la curva, las muestras y los controles fueron cargados en duplicado.

Tabla 3. Partidores y sonda usados en la reacción de qPCR.

Primer/sonda	Secuencia
Cruzi 1	5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3'
Cruzi 2	5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'
Cruzi 3	5'-6FAM-CACACACTGGACACCAA-MGB-NFQ-3'

La mezcla de reacción está compuesta de 5 µL del ADN templado, 0,75 µM de cada partidor, 0,05 µM de la sonda Cruzi 3, 1X de Brilliant Multiplex QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 30 nM de Reference Dye ROX (Agilent Technologies), 1X de Exo IPC Mix, 1x de Exo IPC DNA (Applied Biosystem), 0,1 µM de albúmina sérica bovina (New England

Biolabs Inc) y agua libre de nucleasas para completar un volumen de reacción de 20 uL. Los volúmenes utilizados en el mix corresponden a los descritos en la Tabla 4.

Tabla 4. Volúmenes de reactivos utilizados en el mix por cada reacción.

Reactivo	Volumen	Concentración
Cruzi 1	0,3 µL	0,75 µM
Cruzi 2	0,3 µL	0,75 µM
Cruzi 3	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	

El ensayo fue realizado en el equipo MX3000P (Agilent Technologies) usando un perfil térmico de rendimiento comprobado, el cual se encuentra descrito en la Tabla 5²².

Tabla 5. Perfil térmico usado en ensayo de qPCR.

ETAPA	N° DE CICLOS	TEMPERATURA	TIEMPO
Preincubación	1	25 °C	1 s
		95 °C	10 min
Denaturación	40	95 °C	15 s
Hibridación y extensión		58 C	1 min

5.4. Caracterización clínica

A los individuos estudiados se les tomó un electrocardiograma (ECG) de doce derivaciones como una herramienta para identificar alteraciones sugerentes del progreso de la enfermedad. Este examen fue interpretado por un médico cardiólogo especialista con experiencia en el estudio de la cardiopatía chagásica (Dr. Marcelo Llancaqueo, Hospital Clínico de la Universidad de Chile), quien clasificó los resultados en “Normal”, “Levemente alterado” y “Severamente alterado”. Además de lo anterior, los individuos en estudio fueron contactados para encuestarlos por la presencia de comorbilidades.

5.5. Evaluación de criterios inclusión y/o exclusión a tratamiento etiológico

En base a los datos demográficos y clínicos disponibles en el estudio, se evaluó si los individuos confirmados cumplen con los criterios de inclusión y/o exclusión de tratamiento establecidos en la normativa ministerial. De acuerdo a esto, los individuos que cumplen alguno de los criterios de exclusión de terapia fueron clasificados en “Presencia de comorbilidad” y “Cardiopatía chagásica crónica severa”, según el motivo que los excluye de ser tratados. Por otra parte, con el resto de los individuos se evaluó si pertenecen o no a algún Grupo Prioritario para recibir tratamiento contra la ECh según la normativa vigente⁸.

5.6. Análisis estadístico

Para analizar las edades de los individuos positivos no tratados, se utilizó t-de Student, mientras que para el análisis de los individuos que pueden o no entrar a los grupos prioritarios del tratamiento se usó Chi Cuadrado. Por otra parte, debido al carácter descriptivo del estudio realizado, solo se utilizó estadística descriptiva para el resto de los análisis.

6. Resultados

6.1. Reclutamiento de individuos participantes

Para la pesquisa se logró reclutar a 523 individuos residentes de la comuna de Combarbalá. Del total de participantes reclutados se debió excluir a 8 de ellos porque no se pudo obtener las muestras necesarias para los estudios posteriores.

La mayoría de los individuos reclutados fueron mujeres, con los hombres correspondiendo sólo al 36,3% del total, y la edad promedio entre los participantes fue de 52,4 años. Los datos demográficos obtenidos se muestran resumidos en la Tabla 5. En cuanto a los antecedentes de diagnóstico de la infección, 22 de los individuos declararon haber sido previamente diagnosticados con esta, pero solo 13 de ellos habían sido tratados.

Tabla 5. Datos demográficos de los individuos reclutados en pesquisa.

	Mujeres	Hombres	Total
Número	328	187	515
Edad media (años)	53,5 (DS = 15,8)	55,6 (DS = 16,6)	54,2 (DS = 16,1)

6.2. Caracterización serológica

6.2.1. ELISA IgG

Al hacer el tamizaje con ELISA se obtuvieron un total de 94 casos positivos, 4 indeterminados y 417 negativos. De los individuos que declararon haber sido diagnosticados previamente con la infección 16 fueron positivos en esta prueba, mientras que hubo 3 indeterminados y 3 negativos entre estos individuos (Figura 1). A estos 3 últimos individuos se les repitió la prueba en duplicado, obteniéndose nuevamente resultados negativos.

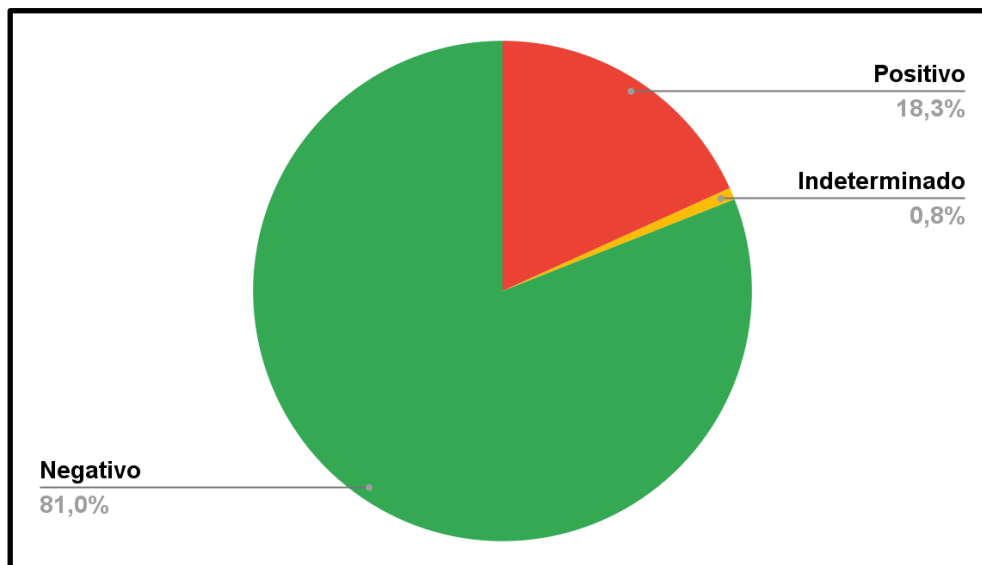


Figura 1. Porcentaje de resultados serológicos positivos, negativos e indeterminados para enfermedad de Chagas en la población estudiada con ELISA IgG

6.2.2. Confirmación de casos

De las 94 muestras positivas enviadas al Laboratorio de Referencia del ISP, 86 fueron confirmadas como positivas (16,7% de todos los individuos reclutados), mientras que 3 fueron negativas y 5 tuvieron resultados no concluyentes, por lo que se solicitó una nueva muestra de estos individuos para su confirmación. En cuanto a las 4 muestras indeterminadas, 2 de estas fueron negativas y las otras 2 obtuvieron resultados no concluyentes, por lo que también se pidió una nueva muestra.

Una vez extraídas las muestras solicitadas por el ISP estas fueron enviadas nuevamente para su confirmación. En cuanto a los 5 casos que fueron positivos en la pesquisa y no concluyentes para el ISP (P-NC), 2 de ellos fueron confirmados como negativos con la segunda muestra, mientras que otros 2 volvieron a tener resultados no concluyentes (Figura 2). El último de los casos P-NC no se presentó cuando se le citó para la extracción de la nueva muestra.

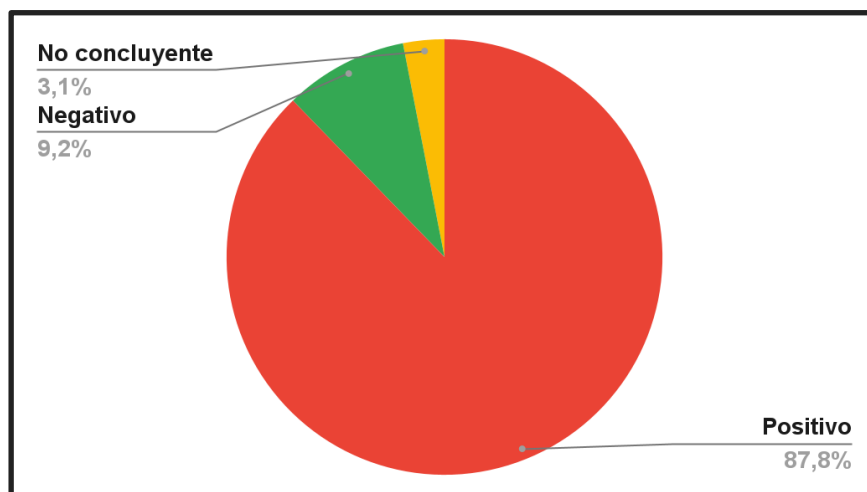


Figura 2. Resultado de la confirmación serológica de positivos e indeterminados para enfermedad de Chagas derivados al ISP.

6.2.3. Selección de individuos para estudios posteriores

De los 86 individuos positivos confirmados por el ISP se seleccionó a aquellos que no habían sido tratados para la infección, lo que corresponde a un total de 76 individuos. En la Tabla 6 se resumen los datos demográficos de estos individuos. En el análisis estadístico de las edades de los individuos con t-de Student se determinó $t_{74} = 1,41$ y $p = 0,16$.

Tabla 6. Datos demográficos de los individuos positivos confirmados por el ISP que no habían sido previamente tratados para la ECh.

	MUJERES	HOMBRES	TOTAL
NÚMERO	49	27	76
EDAD (media)	63,8 (DS = 11,6)	67,6 (DS = 16,4)	65,2 (DS = 11,3)

6.2.4. IFI IgG

Una vez seleccionados los casos, se prosiguió con la titulación de los anticuerpos IgG anti *T. cruzi*. El título más prevalente corresponde a 320 con 26 de los individuos presentando este título (34,2%), seguido de 160 con 19 individuos (25%). La distribución de los títulos obtenidos se encuentran resumidos en la Figura 3 y los resultados individuales de los individuos se muestran en el Anexo VII.

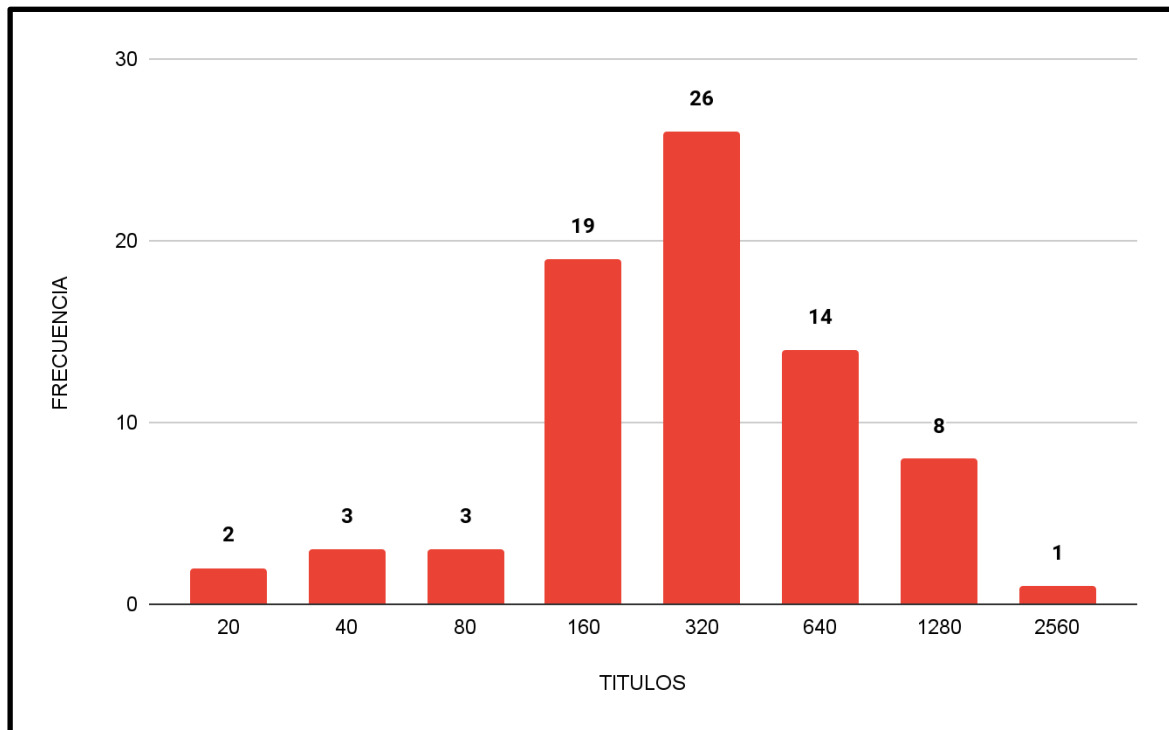


Figura 3. Distribución de títulos de anticuerpos anti *T. cruzi* determinados por IFI IgG.

6.3. Caracterización parasitológica

6.3.1. Amplificación de TaqMan® Exogenous Internal Positive Control (IPC)

Al determinar los resultados del control de IPC en la PCR, se evidenció que la amplificación ocurrió en 73 de los individuos, presentándose una media de 27,18 para los Ct de estas reacciones (Figura 4). La técnica se repitió en las muestras de los tres individuos en los que no

se observó amplificación de este control, pero se volvió a presentar el mismo resultado. Debido a lo anterior, en estos casos no se pudo determinar la presencia de ADN parasitario en sangre periférica.

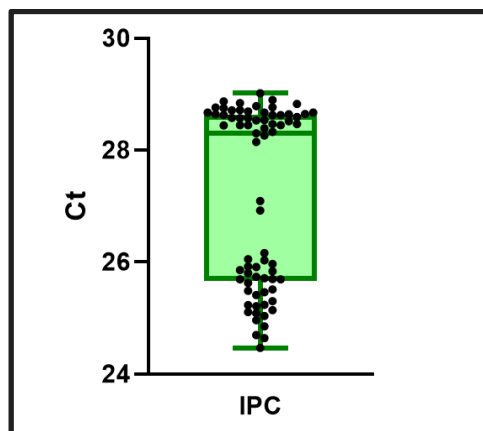


Figura 4. Distribución de los Ct observados para el control de amplificación TaqMan®
Exogenous Internal Positive Control.

6.3.2. Determinación de la parasitemia

Gracias a las características de la técnica usada, la caracterización parasitológica realizada a los individuos estudiados fue tanto cualitativa como cuantitativa. Se determinó que 20 de los individuos presentaron parasitemia detectable, lo que corresponde a una positividad del 27,4%. Por otra parte, al analizar la carga parasitaria se determinó un promedio de 1,86 parásitos-eq/mL (DS=1,9). La distribución de la cargas parasitarias se encuentra graficada en la Figura 5, mientras que los resultados individuales de cada individuo se muestran en el Anexo VII.

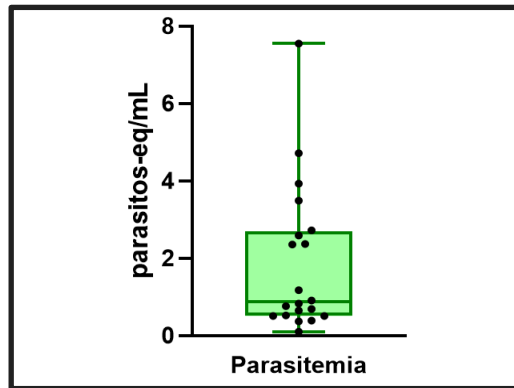


Figura 5. Distribución de la carga parasitaria por *Trypanosoma cruzi* detectada en la sangre periférica de 17 individuos con enfermedad de Chagas.

6.4. Caracterización clínica

6.4.1. Electrocardiograma

Los 76 individuos en estudio fueron citados a control para realizar ECG de 12 derivaciones, trazado que posteriormente fue interpretado e informado por el Dr. Marcelo Llancaqueo. De los 76 individuos, 36 presentaron trazado normal, 22 presentaron alteraciones leves y 18 presentaron alteraciones severas. Estos datos se presentan con sus porcentajes respectivos en la Figura 6, mientras que los resultados individuales de cada individuo se muestran en el Anexo VII.

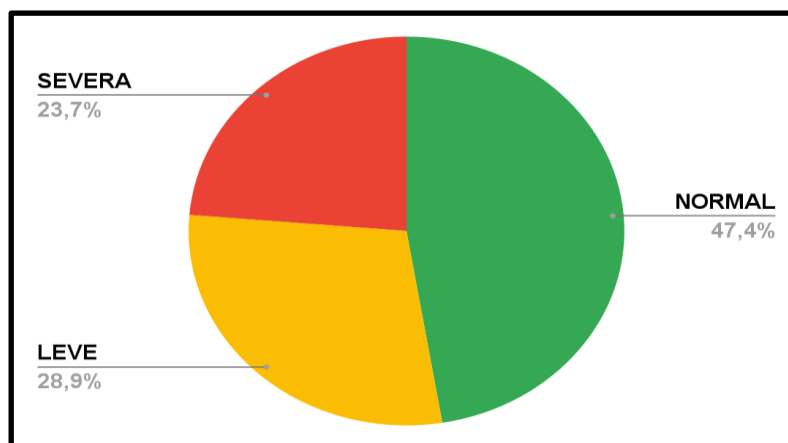


Figura 6. Porcentaje de ECG normal y alterado (leve o severo) en 76 individuos con enfermedad de Chagas crónica.

6.4.2. Presencia de comorbilidades

Los individuos fueron encuestados sobre comorbilidades. 26 de ellos declararon no presentar ninguna, mientras que el resto de los individuos dijo presentar al menos una de las que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Comorbilidades presentadas por los individuos del grupo en estudio.

COMORBILIDAD	NÚMERO DE INDIVIDUOS
No presenta	26
Hipertensión Arterial	37
Diabetes Mellitus	4
Prediabetes	10
Dislipidemia	3
Hipercolesterolemia	17
Hipotiroidismo	8
Cataratas	1
Silicosis	1

6.5. Posibilidad de acceso a tratamiento

En base a los criterios de exclusión establecidos en la normativa ministerial, y a los antecedentes que se tienen disponibles en este estudio, el 25% de los individuos estudiados no pueden ser tratados. 18 de ellos no pueden acceder a tratamiento por presentar un estado avanzado de la cardiopatía chagásica crónica (CCC) (23,7%), mientras que 1 individuo no puede ser tratado por presentar una patología pulmonar crónica (1,3%) (Tabla 8).

Tabla 8. Individuos que no pueden acceder a tratamiento antiparasitario, según criterios ministeriales de exclusión vigentes.

	EXCLUIDO DEL TRATAMIENTO	
	Por CCC	Por comorbilidad
HOMBRES	10	1
MUJERES	8	0
TOTAL	18	1

En cuanto a los 57 individuos restantes que no poseen ningún criterio de exclusión, 40 de ellos no son considerados parte de los grupos prioritarios para recibir el tratamiento antiparasitario, por incumplir los criterios de inclusión a estos. Por otra parte, el número de individuos que sí puede acceder al tratamiento como parte de los grupos prioritarios corresponde a 17, es decir, el 22,4% de los individuos positivos no tratados (Tabla 9).

Todos los individuos que no pueden clasificarse como grupo prioritario para recibir el tratamiento incumplieron el mismo criterio de la normativa ministerial, el cual corresponde a ser “pacientes jóvenes y adultos hasta los 60 años, con serología positiva en fase crónica indeterminada”. 18 de ellos lo incumplieron por ser mayores de 60 años, 8 por estar en la fase determinada de la ECh, y 14 por la combinación de ambos criterios. En el análisis estadístico se obtuvo $\text{Chi-Cuadrado}_6 = 1,52$ y $p = 0,9$.

Tabla 9. Individuos con enfermedad de Chagas crónica que pueden ser considerados grupo prioritario para recibir tratamiento etiológico.

	GRUPO PRIORITARIO			
	SÍ	NO		
		POR EDAD	POR CCC	POR EDAD+CCC
HOMBRES	3	6	3	4
MUJERES	14	12	5	10
TOTAL	17	18	8	14

7. Discusión

En la Encuesta Nacional de Salud (ENS) realizada en los años 2016-2017 se evidenció que la ECh presenta una prevalencia de 1,2% en la población general, la que contrasta con el 2,8% obtenido en la región de Coquimbo²³. Estos resultados muestran que en esta región, al ser zona endémica, la ECh es más común que en el resto del país. En el presente estudio, se observó que 86 de los 515 individuos estudiados en la pesquisa presentan serología positiva para la ECh, lo que corresponde al 16,7%. Este dato, a pesar de que no es comparable con la prevalencia evidenciada en la ENS por las limitaciones metodológicas del estudio, permite demostrar que en la comuna de Combarbalá hay un alto porcentaje de individuos con ECh. Esto genera como interrogante cuál es la real prevalencia de la ECh en esta comuna, lo que podría ser determinado en estudios posteriores aplicando un adecuado diseño metodológico.

Durante la pesquisa, fue posible observar que entre los individuos que afirmaron haber sido diagnosticados previamente con ECh, algunos de ellos presentaron resultados negativos en ELISA. Una posible explicación para esto está en que se trate de resultados falsos negativos. Esta posible explicación para lo observado no pudo ser comprobada, pues el Laboratorio de Referencia del ISP no recibe muestras de individuos con resultados negativos en pruebas de tamizaje, imposibilitando la confirmación de estos casos.

En cuanto a la confirmación de resultados realizada en el ISP, es posible observar que hubo una parte de los individuos cuyo resultado final no pudo ser determinado. Los resultados no concluyentes, si bien son pocos, son un problema importante, pues dejan a los pacientes en la incertidumbre sin un resultado definitivo. En zonas de alta endemia, los resultados discordantes como estos podrían ser en verdad casos positivos, lo que se explicaría por una baja sensibilidad de las pruebas confirmatorias o por posibles interferentes en estas²⁴. Todo esto implica además,

que aquellos individuos no podrían acceder al tratamiento de forma preventiva, pues en Chile solo se trata a aquellos individuos que han sido confirmados como positivos¹⁴. Debido a lo anterior, es de gran importancia que se hagan estudios para determinar el rendimiento de las técnicas serológicas convencionales y los factores que puedan interferir en los resultados de estas. Adicionalmente, la búsqueda de técnicas de laboratorio con un mayor rendimiento resulta fundamental, ya que podrían aportar a realizar un diagnóstico más eficiente de la infección.

Al analizar los resultados de IFI, fue posible apreciar que entre los individuos positivos no tratados el título que se encontró con mayor frecuencia fue 320, seguido de 160 y 640. Esto difiere de lo observado en los resultados presentados por Muñoz et al., donde los individuos positivos no tratados muestran una tendencia a tener títulos más altos, siendo 1280 el título más frecuente, seguido de 640 y 320¹⁹. Curiosamente, en ese trabajo la distribución de los títulos de las personas tratadas se asemeja más a la obtenida en el presente estudio. Una posible explicación para la diferencia observada puede ser una variación en la conservación de los sueros estudiados. Los sueros utilizados en el desarrollo de esta tesis habían sido extraídos recientemente, habiendo transcurrido un máximo de 5 meses entre la obtención del suero y la realización de las IFI. Si los sueros utilizados en el estudio de Muñoz et al. eran muy antiguos, es muy probable que se deshidrataran y que por esto los anticuerpos presentes en ellos se hubieran concentrado, aumentando así sus títulos.

Con respecto a la parasitemia, en este estudio se confirman las bajas parasitemias circulantes descritas en esta etapa de la ECh, lo que constituye en la actualidad un importante desafío para los laboratorios de diagnóstico²⁵. Si bien también es conocido que las parasitemias son además de bajas, fluctuantes, en este estudio no es posible evidenciar esa variable de comportamiento de la infección, pues no se tomaron muestras seriadas²⁶. Esto sería altamente recomendable, pues aumentaría la positividad obtenida con una sola muestra directa como en el presente

estudio, que correspondió al 27,4%. Es conocido además, que la sensibilidad en la detección de *T. cruzi* puede aumentar aplicando métodos que amplifican las formas tripomastigotas circulantes, como hemocultivo y xenodiagnóstico, sin embargo estas son técnicas que están en desuso^{27, 28}. Esto último se debe fundamentalmente a la laboriosidad de dichas técnicas y al tiempo que toma obtener resultados, el que puede alcanzar los 90 días²⁹. En los resultados obtenidos, resulta de particular interés destacar que más de la mitad de los individuos estudiados presentan alteraciones electrocardiográficas. Esto implica que un número importante de los individuos de Combarbalá ya no se encuentran en la fase crónica indeterminada de la ECh, sino que pasaron a la fase determinada. En la literatura se describe que esta transición de fase ocurre solo en el 20-30% de los individuos con ECh, lo que contrasta con el 52,4% obtenido en este estudio⁶. Estos valores tan elevados en el número de individuos que presentan la CCC puede que expliquen la elevada tasa de mortalidad que hay en la comuna de Combarbalá para la ECh. Considerando lo anterior y el hecho de que la región de Coquimbo es la que tiene la tasa de mortalidad más alta en Chile, es muy probable que la elevada proporción de individuos con CCC no sea un problema únicamente en Combarbalá, sino que esté presente en toda la región¹⁷. En cuanto al análisis de los criterios de exclusión del tratamiento, el 25% de los individuos estudiados posee criterios de exclusión para ser tratados. De este grupo de individuos que cumplen criterios de exclusión, el 94,7% de ellos no pueden ser tratados porque presentan un estado demasiado avanzado de la CCC, mientras que solo el 5,3% cumplió un criterio distinto de este. En base a esta cantidad tan alta de individuos que no pueden ser tratados por la CCC, es posible sospechar que si los pacientes con ECh no son diagnosticados de forma oportuna, puede que las probabilidades de que el progreso de la enfermedad les impida ser tratados sean mayores, lo que podría ser estudiado en investigaciones futuras.

Por otra parte, al analizar si los individuos que no cumplen ningún criterio de exclusión pueden ser considerados o no parte de los grupos prioritarios para recibir el tratamiento, se encontró que el 70,2% de ellos no cumplen los criterios para entrar en estos grupos. Este porcentaje indica que solo a una pequeña proporción de los individuos se les dará prioridad al momento de recibir la terapia antiparasitaria. La principal consecuencia de esto es que los individuos que no clasificaron dentro de este grupo no podrán ser tratados inmediatamente. A su vez, retrasar la terapia estaría aumentando la probabilidad de que los individuos comenzaran a presentar la CCC o que esta aumentara su severidad, al punto de que ya no podrían ser tratados. Lo que fue mencionado anteriormente, puede resultar ser una de las causas de que haya un número bajo de personas satisfactoriamente tratadas.

Esta parasitosis es una enfermedad desatendida tanto en países endémicos como en los no endémicos, pues se estima que menos del 1% de las personas infectadas acceden al tratamiento³⁰. Resulta relevante que de los 22 individuos que declararon haber sido previamente diagnosticados para la ECh sólo 13 de ellos hubieran recibido tratamiento, pues esto deja en evidencia que en Chile hay un porcentaje importante de personas que a pesar de haber sido diagnosticadas con la enfermedad no han sido tratadas.

Finalmente, señalar que existen ensayos clínicos que incluyen como criterio de inclusión la parasitemia demostrada por PCR. Si se consideraran los resultados con parasitemia obtenidos en este estudio con sólo una muestra (27,4%), un 75,4% de los casos que hemos establecido como candidatos a tratamiento quedarían excluidos, lo que es crítico. Por tanto, se sugiere, realizar estudio parasitológico seriado (al menos 3 muestras) de cada individuo antes de iniciar tratamiento, para aumentar las posibilidades de detectar formas parasitarias circulantes, tal como ha sido propuesto por otros investigadores³¹.

Por todas estas razones, resulta de vital importancia el buscar estrategias que ayuden a aumentar la cantidad de personas infectadas que puedan acceder a los fármacos y de forma oportuna. Una posible forma de abordar este problema sería revisar la normativa ministerial y cambiar algunos de los criterios de inclusión a los grupos prioritarios, de modo que un mayor número de personas con ECh puedan ser tratadas oportunamente, evitando así las complicaciones asociadas a la forma determinada de la enfermedad.

8. Conclusiones

Tal como se había planteado como objetivo general, en este estudio se logró caracterizar a individuos con ECh provenientes de la comuna de Combarbalá. En cuanto a la caracterización serológica, se observó que 76 de los 515 individuos estudiados (14,8%) presentan serología positiva confirmada y que además no han sido tratados, demostrando así que en esta comuna hay un número importante de personas que no han recibido el tratamiento antiparasitario. Adicionalmente, la mayor parte de ellos presentan anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* cuyos títulos tienden a 320.

Como parte de este mismo análisis, se evidenció que existe una cantidad limitada de casos cuyo diagnóstico serológico es complejo, para los cual no se pudo obtener un resultado definitivo. Debido a esto, es importante buscar nuevas estrategias diagnósticas que permitan resolver los casos en que se presentan discordancias.

Otra cosa importante a considerar, son los resultados obtenidos en la caracterización clínica de los individuos estudiados, pues mostraron que el 52,4% de ellos ya se encuentran presentando la CCC, algunos de ellos presentando ya un alto avance de la patología. Este porcentaje, al tratarse de una cifra tan elevada, es posible relacionarla con la alta mortalidad de la ECh en esta comuna y en la región de Coquimbo, lo que permite suponer que en esta zona del país la ECh es un problema que está siendo gravemente desatendido.

Se confirman las bajas cargas parasitarias descritas para esta etapa de la ECh, aspecto crítico para la caracterización parasitológica pre-terapia y el seguimiento de casos tratados. Se sugiere no excluir a individuos que cumplen con todos los criterios de inclusión y que tienen una única muestra con resultados parasitológicos negativos. Se sugiere, en caso de que se considere este

criterio parasitológico de inclusión, evaluar en cada paciente, al menos tres puntos de estudio parasitológico en un determinado período de tiempo.

Finalmente, este estudio buscó determinar la posibilidad de acceso al tratamiento antiparasitario por parte de los individuos infectados. En los resultados se pudo observar que el 75% de los individuos estudiados podrían acceder al tratamiento pues no cumplen ninguno de los criterios de exclusión para este. Sin embargo, esto no significa que serán inmediatamente tratados, pues la mayor parte de ellos no cumplen con los criterios para recibir el tratamiento de forma prioritaria. Esto implica que, debido a que no serán tratados oportunamente, la enfermedad podría progresar e incluso podría llevarlos a la muerte. Debido a todo lo anterior, si se revisara la normativa ministerial y se disminuyera la cantidad de filtros impuestos para determinar el acceso prioritario al tratamiento, se podría conseguir que los fármacos antiparasitarios puedan ser entregados oportunamente a las personas que los necesitan. Si bien la transmisión vectorial ya fue erradicada en el país, aún hay muchas personas que siguen siendo afectadas por la enfermedad, por lo que a nivel país debe generarse mayor conciencia sobre la gravedad del problema que asola a los habitantes de Combarbalá y de la región de Coquimbo, y buscar formas resolverlo.

9. Referencias Bibliográficas

1. Perez Molina J, Molina I. (2018). Chagas disease. *Lancet*; 391: 82-94
2. Coura JR. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*;102(suppl 1):113–22.
3. World Health Organization (WHO). (2002). Control of Chagas disease : second report of the WHO expert committee. World Health Organization.
4. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. (2010) Chagas disease. *Lancet*; 375(9723):1388–402
5. Ribeiro AL, Rocha MO. (1998). [Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis]. *Rev Soc Bras Med Trop*; 31(3):301–14.
6. Malik LH, Singh GD, Amsterdam EA. (2015). The epidemiology, clinical manifestations, and management of Chagas heart disease: Chagas heart disease. *Clin Cardiol*; 38(9):565–9.
7. Nunes MCP, Dones W, Morillo CA, Encina JJ, Ribeiro AL, Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology. (2013). Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J Am Coll Cardiol*; 62(9):767–76.
8. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2018). Manual de procedimiento para la atención de pacientes con enfermedad de Chagas.
9. Apt W, Heitmann G I, Jercic L MI, Jofré M L, Muñoz C. del P V, Noemí H I, et al. (2008). Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. *Rev Chilena Infectol*; 25(3).
10. Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. (2018). An update on benznidazole for the treatment of patients with Chagas disease. *Drugs Today (Barc)*; 54(1):15–23.

11. Apt W, Llancaqueo M, Zulantay I, Canals M, Kara S, Arribada A, et al. (2021). Clinical, electrocardiographic and echocardiographic evolution of chronic Chagas disease treated with nifurtimox on prolonged follow-up in Chile: observational study. *J Glob Antimicrob Resist*; 27:160–6.
12. Jackson Y, Wyssa B, Chappuis F. (2020) Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*; 75(3):690–6.
13. Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. (2021) Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. *Drugs Today (Barc)*; 57(4):251–63.
14. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2014). Norma General Técnica. Control y Prevención Nacional de la Enfermedad de Chagas. 2014.
15. Roca C, Pinazo MJ, López-Chejade P, Bayó J, Posada E, López-Solana J, et al. (2011). Chagas disease among the Latin American adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis*; 5(4):e1135.
16. Lorca H M, García C A, Bahamonde M MI, Fritz M A, Tassara O R. (2001). Certificación serológica de la interrupción de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en Chile. *Rev Med Chil*; 129(3).
17. Salas R P. (2020). Epidemiología de la enfermedad de Chagas: alta mortalidad y tasa de incidencia, Región de Coquimbo. *Rev Chilena Infectol*; 37(4):402–12.
18. Instituto Nacional de Estadísticas (INE). (2019). Resultados CENSO 2017. 2019.
19. 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.

20. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile.(2011) Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas.
21. Saldías F, Zuñiga R, Zulantay I, Carrasco D, Fuentealba C, Muñoz G. (2019). Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica. Evaluación parasitológica en el punto final de seguimiento prolongado (8 a 10 años). Escuela de Tecnología Médica.
22. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, 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.
23. Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. (2017). Encuesta Nacional de Salud 2016-2017.
24. Levy MZ, Bowman NM, Kawai V, Plotkin JB, Waller LA, Cabrera L, et al. (2009). Spatial Patterns in discordant diagnostic test results for Chagas Disease: Links to transmission hotspots. *Clin Infect Dis*; 48(8):1104-1106.
25. Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, et al. (2020). Contributions of molecular techniques in the chronic phase of Chagas disease in the absence of treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin*; 38(8):356-360.
26. Alonso-Padilla J, López MC, Esteva M, Zrein M, Casellas A, Gómez I, et al. (2021). Serological reactivity against *T. cruzi*-derived antigens: Evaluation of their suitability for the assessment of response to treatment in chronic Chagas disease. *Acta Trop*; 221:105990
27. Vallejo M, Reyes PP, Martínez-García M, González-Garay AG. (2020). Trypanocidal drugs for late-stage, symptomatic Chagas disease (*Trypanosoma cruzi* infection). *Cochrane Database Syst Rev*;12(12):CD004102.

28. Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA.(2003). Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase [Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction]. *Rev Saude Publica*;37(1):107-15.
29. Zulantay I, Muñoz, G, Liempi D, Rozas T, Manneschi M.J, Muñoz-San Martín C, et al. 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.
30. Alonso J, Cortés N, Pinazo MJ, Bottazzi ME, Abril M, Barreira F, et al. (2018). Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. *Expert Rev Anti Infect Ther*; 17(3):145-157.
31. Parrado R, Ramirez JC, de la Barra A, Alonso-Vega C, Juiz N, Ortiz L, et al. (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.

10. Anexos

I. Acta de aprobación del Comité de Ética y Consentimiento Informado Proyecto 011-2017



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,

Arta Javiera Cobo Riveros
Secretaría Ejecutiva - CEISH
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



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:

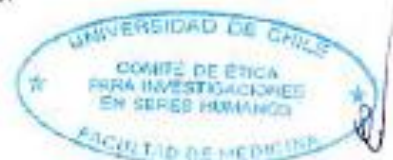
Toda la información obtenida de su participación en este estudio será confidencial. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de esta investigación será anónima.

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-Clinico 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-Clinico, 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
 229786753



09 JUL 2019

II. Procedimiento ELISA:

El kit comercial utilizado corresponde al Test ELISA Chagas III de BiosChile, y todos los reactivos usados en la técnica fueron provistos por este. Como controles se utilizaron el control positivo y negativo del kit, y además unos controles externos.

1. A cada pocillo se le agregaron 200 μL de solución Diluyente de Muestra.
2. En los pocillos se agregaron 20 μL de los controles y de las muestras. Los controles positivos y negativos se hicieron en duplicado, tanto los del kit como los externos, sin embargo estos últimos no se utilizaron en el cálculo del cut-off.
3. La placa se selló con papel adhesivo y se incubó a 37 °C por 30 minutos.
4. Posteriormente se realizaron tres lavados, añadiendo 300 μL de Solución de Lavado a cada pocillo durante 30 segundos.
5. Se agregaron 100 μL de Conjugado a cada pocillo, se selló la placa con papel adhesivo y nuevamente se incubó a 37 °C por 30 min.
6. Se repitieron los tres lavados y se agregó 100 μL de Sustrato en cada pocillo, tras lo cual se procedió a incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en la oscuridad.
7. Sin eliminar el contenido de los pocillos, se añadieron 100 μL de Solución de Detención en cada pocillo, tras lo cual se hizo la lectura de la placa con un filtro de 450 nm.

III. Procedimiento Inmunofluorescencia Indirecta:

1. Se prepararon las siguientes diluciones del suero a investigar y de los sueros control: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 y 1/1280. Los sueros fueron diluidos con buffer fosfato pH 7,2.
2. 15 μ L de las diluciones fueron distribuidas en pocillos con epimastigotes fijados presentes en placas de vidrio, asignado un pocillo para cada dilución.
3. Se incubaron las placas por 40 minutos a 37 °C.
4. Se realizaron dos lavados con buffer fosfato de 5 minutos cada uno, tras lo que las placas se dejaron secar a temperatura ambiente.
5. A cada pocillo se le agregaron 15 μ L de una globulina anti-IgG humana marcada con fluoresceína para IFI (Fluoline G, bioMérieux), el cual fue previamente diluido en 1/100 con Azul de Evans 1/1000. Luego se incubaron las placas a 37 °C por 40 minutos.
6. Las placas se volvieron a lavar dos veces con buffer fosfato por 5 minutos cada lavado, dejándolas secar a temperatura ambiente.
7. En las placas se añadió glicerol diluido en buffer fosfato 1/1, para luego cubrir los pocillos con un cubreobjetos y pasar a realizar la lectura en un microscopio de fluorescencia.

IV. Procedimiento extracción ADN:

1. Se utilizaron 200 μL de cada muestra, a los que se le agregaron 25 μL de Proteinasa K.
2. A la mezcla se añadieron 300 μL de Buffer de Lisis, tras lo cual se agitó en un vortex por 15 segundos y se centrifugó brevemente.
3. Las muestras se incubaron por 10 minutos a 65 °C, agitadas y centrifugadas nuevamente a los 5 minutos y al final de la incubación.
4. Se añadieron 350 μL de etanol frío, tras lo que se agitó en vortex por 20 segundos y se centrifugó.
5. Se traspasaron 500 μL de muestra a columnas de extracción, las cuales fueron centrifugadas a 15.000 rpm por 1 minuto.
6. Las columnas fueron transferidas a otro tubo colector y se eliminó el desecho del anterior junto al tubo.
7. Se tomó el contenido restante de muestra en el tubo original y se centrifugó a 15.000 rpm por 1 minuto, tras lo que se volvió a eliminar el tubo colector con su contenido.
8. Las columnas fueron transferidas a un nuevo colector y se les añadieron 500 μL de Buffer HBC.
9. Las columnas se volvieron a centrifugar a 15.000 rpm por 1 minuto, y luego se eliminó el desecho pero se reutilizó el tubo colector.
10. Se añadieron 700 μL de DNA Wash y se centrifugó a 15.000 rpm por 1 minuto. Se eliminó el desecho y se reutilizó el tubo.
11. El paso anterior se repitió y luego se hizo un lavado en seco en un tubo colector nuevo, sin agregar DNA Wash y centrifugando a 15.000 rpm por 2 minutos.

12. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de microcentrífuga y se le añadieron 50 μL de Buffer de Elusión.
13. La columna se dejó reposar por 5 minutos y se centrifugó a 15.000 rpm por 1 minuto, tras lo que se desechó la columna y se guardó el tubo de microcentrífuga con ADN a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V. Procedimiento cuantificación ADN:

1. Se preparó la solución de trabajo diluyendo el reactivo Qubit® dsDNA HS Reagent con el reactivo Qubit® dsDNA HS Buffer en relación 1:200.
2. En los tubos destinados a los estándares del kit, se agregó 190 μL de la solución de trabajo, y luego se añadieron 10 μL de los estándares a los tubos correspondientes. Luego de esto se agitó con vortex por 2-3 segundos.
3. En los tubos destinados a las muestras, se agregaron 195 μL de la solución de trabajo, y luego se añadieron 5 μL de las muestras correspondientes. Luego de esto se agitaron los tubos en vortex por 2-3 segundos.
4. Todos los tubos se incubaron a temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Se realizó la lectura de la fluorescencia en el equipo.

VI. Resultados títulos, parasitemia y alteraciones electrocardiográficas

CASO	TÍTULO	PARASITEMIA	ECG	CASO	TÍTULO	PARASITEMIA	ECG
5303	640	1,18	Normal	5602	640	0,52	Normal
5309	640	(-)	Normal	5603	160	(-)	Severa
5314	320	(-)	Leve	5608	160	(-)	Leve
5364	1280	(-)	Normal	5611	160	0,37	Severa
5385	1280	(-)	Leve	5612	320	0,51	Leve
5392	320	0,76	Normal	5614	640	(-)	Normal
5397	640	(-)	Normal	5616	640	(-)	Normal
5410	320	(-)	Normal	5632	160	0,91	Normal
5413	320	2,37	Severa	5636	320	(-)	Severa
5421	640	7,55	Severa	5640	160	(-)	Leve
5424	320	(-)	Severa	5646	320	(-)	Normal
5426	40	(-)	Leve	5650	1280	(-)	Leve
5427	1280	3,93	Severa	5651	160	(-)	Leve
5435	640	(-)	Normal	5656	320	(-)	Severa
5444	320	(-)	Severa	5658	320	(-)	Normal
5447	640	(-)	Normal	5674	320	(-)	Normal
5464	160	(-)	Severa	5678	640	(-)	Normal
5470	20	(-)	Normal	5679	640	(-)	Leve
5472	320	(-)	Normal	5680	1280	0,51	Normal
5489	320	(-)	Normal	5683	320	No determinado	Leve
5509	640	2,59	Normal	5684	20	No determinado	Normal
5514	320	(-)	Leve	5687	320	(-)	Leve
5515	1280	0,39	Severa	5688	320	No determinado	Normal
5528	320	(-)	Normal	5695	160	(-)	Normal

5531	640	2,72	Normal	5700	320	(-)	Severa
5532	640	(-)	Normal	5733	1280	(-)	Leve
5536	160	4,72	Leve	5738	160	0,1	Leve
5541	320	3,49	Normal	5742	80	(-)	Leve
5543	320	(-)	Leve	5743	160	(-)	Severa
5544	2560	(-)	Severa	5745	160	(-)	Severa
5558	40	(-)	Normal	5750	320	(-)	Normal
5569	80	0,83	Leve	5772	80	(-)	Normal
5574	320	(-)	Normal	5776	160	(-)	Severa
5588	160	0,65	Leve	5783	320	0,69	Normal
5590	1280	2,36	Severa	5784	160	(-)	Normal
5597	40	(-)	Leve	5786	160	(-)	Leve
5599	160	(-)	Normal	5799	160	(-)	Severa
5601	160	(-)	Normal	5800	320	(-)	Leve