



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE
XENODIAGNÓSTICO, PCR TIEMPO FINAL
Y PCR TIEMPO REAL EN DEYECCIONES DE *Triatoma infestans*
ALIMENTADOS SOBRE INDIVIDUOS CHAGÁSICOS CRÓNICOS

MIGUEL SAAVEDRA MESA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

PROFESOR GUÍA: INÉS ZULANTAY ALFARO

FINANCIAMIENTO: Proyecto FONDECYT 1100768

SANTIAGO, CHILE
2013



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS



DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE XENODIAGNÓSTICO, PCR TIEMPO FINAL Y PCR TIEMPO REAL EN DEYECCIONES DE *Triatoma infestans* ALIMENTADOS SOBRE INDIVIDUOS CHAGÁSICOS CRÓNICOS

MIGUEL SAAVEDRA MESA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina
Preventiva Animal

NOTA FINAL:

		NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA	: INÉS ZULANTAY
PROFESOR CONSEJERO	: JOSÉ PIZARRO
PROFESOR CONSEJERO	: LEONARDO SÁENZ

SANTIAGO, CHILE

2013

MEMORIA DE TÍTULO

“DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* MEDIANTE XENODIAGNÓSTICO, PCR TIEMPO FINAL Y PCR TIEMPO REAL EN DEYECCIONES DE *Triatoma infestans* ALIMENTADOS SOBRE INDIVIDUOS CHAGÁSICOS CRÓNICOS”.

“DETECTION OF *Trypanosoma cruzi* BY XENODIAGNOSIS, FINAL TIME PCR AND REAL TIME PCR IN DEJECTIONS OF *Triatoma infestans* FED ON CHRONIC CHAGASIC INDIVIDUALS”.

Miguel Angel Saavedra Mesa*

*Laboratorio de Parasitología Básico Clínico, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile. Financiado por Proyecto Fondecyt 1100768.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas constituye uno de los principales problemas de Salud Pública en países como Brasil, Bolivia y Chile. Esta parasitosis es producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y se caracteriza por presentar una fase aguda, generalmente sintomática y una crónica asintomática que puede ser de larga evolución. El diagnóstico en esta última fase se basa fundamentalmente en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante técnicas serológicas, debido a que las parasitemias pueden ser bajas y fluctuantes.

Si bien las reacciones de PCR Tiempo Final y PCR Tiempo Real (qPCR) han permitido un importante avance en el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi*, es posible combinarlas con técnicas parasitológicas convencionales como el xenodiagnóstico (XD). En este trabajo, se evaluó la eficacia del diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* mediante tres técnicas convencionales/no convencionales.

Xenodiagnóstico convencional fue aplicado a 50 pacientes con enfermedad de Chagas crónica procedentes de la IV Región de Coquimbo, Chile. Posterior al examen microscópico de las deyecciones de los triatominos a los 30, 60 y 90 días post alimentación sobre el paciente, las muestras fecales de los triatominos obtenidas en el XD fueron procesadas para realizar PCR Tiempo Final (PCR-XD) y PCR Tiempo Real (qPCR-XD) en los 3 períodos de estudio.

A los 30 días, la positividad fue del 6%, 68% y 88% para XD, PCR-XD y qPCR-XD, respectivamente. A los 60 días, la positividad fue de 14%, 74% y 96% y, a los 90 días, del 24%, 76% y 98%. Mediante las pruebas de Cochran y Mc Nemar fue posible determinar que a los 30 días no existen diferencias significativas entre la positividad de PCR-XD y qPCR-XD (p -value=0.063). Por el contrario, a los 60 y 90 días, qPCR-XD presenta diferencias significativas con las técnicas de XD y PCR-XD (p -value=0.003).

Se concluye que la técnica de qPCR-XD es más eficiente que XD y PCR-XD en el diagnóstico de *T. cruzi*, pues no sólo confirma la presencia del parásito, sino que permite cuantificar la carga presente en el vector biológico. No obstante, los resultados de la cuantificación parasitaria en las deyecciones de los triatominos no pueden ser extrapolados a la parasitemia circulante en el paciente, pues en la técnica de XD existen variables imposibles de controlar, como la capacidad individual de los triatominos para alimentarse sobre el paciente infectado.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi* - Enfermedad de Chagas - Xenodiagnóstico - PCR

SUMMARY

Chagas disease is one of the main public health problems in countries like Brasil, Bolivia and Chile. This parasitosis is produced by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi* and is characterized by a generally symptomatic acute phase and a chronic asymptomatic phase which may have a long evolution. The diagnosis in the latter phase is based fundamentally on the detection of anti-*T.cruzi* antibodies using serological techniques, since parasitemia may be low and fluctuating.

Although the use of PCR and Real-Time PCR (qPCR) has allowed an important advance in the parasitological diagnosis of *T. cruzi*, they may be combined with conventional parasitological techniques such as xenodiagnosis (XD). This study evaluated the efficacy of the parasitological diagnosis of *T.cruzi* using three conventional and non-conventional techniques.

Conventional xenodiagnosis was applied to 50 patients with chronic Chagas disease from the IV Región de Coquimbo, Chile. After the microscopic analysis of the dejections of triatomines 30, 60 and 90 days after feeding on the patients, the fecal samples of the triatomines of the three periods were processed and used for conventional PCR (PCR-XD) and Real-Time PCR (qPCR-XD).

After 30 days, 6%, 68% and 88% were positive by XD, PCR-XD and qPCR-XD, respectively. After 60 days 14%, 74% and 96% were positive, and after 90 days the percentages were 24%, 76% and 98%, respectively. Cochran and McNemar tests showed that the difference between PCR-XD and qPCR-XD was not significant after 30 days ($p = 0.063$), while after 60 and 90 days qPCR-XD was significantly different from XD and PCR-XD ($p = 0.003$).

I conclude that the qPCR-XD technique is more efficient than XD or PCR-XD in the diagnosis of *T. cruzi*, since not only does it confirm the presence of the parasite, but also allows quantification of the load present in the biological vector. However, the results of parasite quantification in triatomine dejections cannot be extrapolated to the parasitemia circulating in the patient, since there are variables in the XD technique which are impossible to control, such as the individual capacity of triatomines to feed on the infected patient.

Key Words: *Trypanosoma cruzi* - Chagas disease - Xenodiagnosis - PCR

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad, se encuentra distribuida desde el sur de Estados Unidos hasta el sur de la Patagonia y debido a sus implicancias médicas, sociales y económicas constituye uno de los principales problemas de salud pública de Latinoamérica. En Chile se estima que existen más de 150.000 individuos infectados desde la región de Arica y Parinacota hasta la región de O'Higgins, incluida la Región Metropolitana. Las regiones rurales y periurbanas de las regiones de Atacama y Coquimbo son consideradas hiperendémicas (Apt *et al.*, 2005; Moncayo, 2003).

La enfermedad requiere para su transmisión, la participación de vectores biológicos y hospederos mamíferos, incluido el hombre. En Chile, se han descrito los insectos triatominos *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardo* (Apt *et al.*, 2008). La transmisión vectorial es considerada el mecanismo de mayor relevancia epidemiológica en el continente. Otras vías de transmisión la constituyen, la vía congénita, los accidentes de laboratorio, las transfusiones sanguíneas (Moncayo, 2003) y la ingesta de alimentos contaminados con deyecciones de triatominos (Barbosa, 2006).

La enfermedad de Chagas presenta dos períodos: agudo, caracterizado por altas parasitemias y crónico. Éste último puede ser indeterminado (asintomático) y determinado (Apt, 1999), caracterizado por una baja cantidad de parásitos en circulación. Debido a esto, es que la elección de los métodos de diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende de la etapa de la enfermedad. Es así como en fase aguda, los más apropiados son los métodos directos parasitológicos como hemocultivo y xenodiagnóstico (XD), sin embargo, estas técnicas tienen sensibilidad limitada. En la fase crónica, los exámenes indirectos serológicos como ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), son los más recomendados (Zulantay *et al.*, 1998).

Existe consenso que la detección y tratamiento precoz de la infección por *T. cruzi* aumenta las posibilidades de curación. Desde este punto de vista, un método diagnóstico precoz y eficaz implica reducir la evolución patológica de la enfermedad. La reacción de la polimerasa en cadena (PCR), ha evidenciado alta sensibilidad en la detección de *T. cruzi* (Brito, 2009), a pesar de ser una técnica cualitativa (Burgos *et al.*, 2009). La aplicación de PCR Tiempo Real (qPCR), variante cuantitativa de la original, ha abierto una ventana para detectar y evaluar carga parasitaria por *T. cruzi* y evaluar eficacia de fármacos en el tratamiento

antichagásico. En el presente estudio, se evaluó la eficacia de XD, PCR-XD y qPCR-XD para detectar y/o cuantificar *T. cruzi* desde purificados de deyecciones de *T. infestans*.

HIPÓTESIS

- H0:** No existen diferencias entre los métodos de Xenodiagnóstico, PCR Tiempo Final y PCR Tiempo Real en el diagnóstico de *T. cruzi* en deyecciones de triatomíneos alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos.
- H1:** Existen diferencias entre los métodos de Xenodiagnóstico, PCR Tiempo Final y PCR Tiempo Real en el diagnóstico *T. cruzi* en deyecciones de triatomíneos alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la eficacia del diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* mediante tres técnicas convencionales/no convencionales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer, purificar y cuantificar ADN total desde deyecciones de triatomíneos alimentados mediante xenodiagnóstico en individuos chagásicos crónicos.
- Detectar mediante
 - Xenodiagnóstico,
 - PCR Tiempo Final,
 - y PCR Tiempo Real, la presencia de *T. cruzi*.
- Comparar los resultados obtenidos en las tres técnicas parasitológicas: determinar precocidad en la detección de *T. cruzi*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Individuos en estudio

El estudio se realizó en 50 individuos con enfermedad de Chagas crónica, condición confirmada mediante las técnicas serológicas convencionales de IFI y ELISA IgG (Zulantay *et al.*, 2007) procedentes de localidades urbanas o rurales de las Provincias de Choapa (Comunas de Illapel, Salamanca, Los Vilos y Canela) y Limarí (Combarbalá), áreas endémicas de la IV Región de Coquimbo. Todos ellos aceptaron formar parte del estudio bajo Consentimiento Informado (Proyecto Fondecyt 1100768, Anexo 1) aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile (Resolución 049-2009, Anexo 2). La edad promedio de la población en estudio fue de 49 años (intervalo: 10-70 años). 71 de ellos de género femenino y 29 de género masculino.

2. Medidas de Bioseguridad

En las diferentes etapas de las técnicas de XD, PCR-XD y qPCR-XD, se aplicaron medidas de protección, tales como guantes quirúrgicos, antiparras y mascarilla para evitar todo contacto con los triatominos y sus deyecciones. En el caso de las purificaciones de ADN, preparación de mix de reacción y análisis en termocicladores, se utilizaron los mismos implementos además de campanas de bioseguridad y flujo laminar.

3. Técnicas parasitológicas

Se aplicaron las técnicas de XD, PCR Tiempo Final de deyecciones de triatominos alimentados mediante XD (PCR-XD) y PCR Tiempo Real (qPCR-XD), según se describe a continuación:

3.1 Xenodiagnóstico

A los individuos en estudio se aplicó XD, según técnica descrita por Schenone (Schenone, 1999), consistente en dos cajitas, cada una con siete ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans* libres de infección. Luego de su aplicación por 20 a 30 minutos en la cara externa de

cada brazo del paciente, las cajas fueron mantenidas a 27°C y 75% de humedad. Posteriormente, se realizó el examen microscópico entre porta y cubreobjetos de las deyecciones de los insectos a los 30, 60 y 90 días post alimentación, en búsqueda de formas móviles de *T. cruzi*. La presencia de un parásito por campo se consideró como resultado positivo de XD.

Si bien el XD es una técnica cualitativa, en los XD positivos se estimó la cantidad de formas parasitarias presentes, mediante el establecimiento de 3 rangos de concentración de formas móviles/campo observado, mediante sistema de cruces, como sigue:

Tabla 1. Estimación cualitativa de la positividad del Xenodiagnóstico.

Valor	formas móviles/campo (40x)
+	1
++	2 - 4
+++	5 ó >

3.1.1 Muestras de deyecciones de triatominos de XD para PCR-XD.

En forma paralela a la observación microscópica, se preparó un “pool” de las deyecciones de las vinchucas analizadas a los 30, 60 y 90 días de incubación. Las deyecciones de los triatominos fueron recibidas en 500 µl de PBS pH 7,2. Posteriormente, el “pool” fue incubado durante 15 minutos a 98°C y centrifugado por tres minutos a 3.500 rpm. Los sobrenadantes de 200 µl fueron almacenados a -20°C hasta su uso (Zulantay *et al.*, 2007).

3.1.2 Purificación de ADN de las muestras de deyecciones

El proceso de purificación del sobrenadante del “pool” de deyecciones se realizó con el kit FavorPrep Blood Genomic DNA Extracción Mini Kit (Favorgen), a partir de un volumen de 100 µl de sobrenadante, al cual, previo a la extracción, se adicionó una cantidad conocida de ADN genómico humano, que actúa como control exógeno interno (Bravo *et al.*, 2012), verificando el proceso de extracción y la reacción de qPCR. Paralelamente se hizo otra extracción de 100 µl de muestra de XD sin el agregado de CIE, para poder cuantificar la cantidad de ADN total en el XD. La muestra fue transferida a columnas de sílica gel, utilizando los reactivos según especificaciones del fabricante y posterior a la extracción del ADN, el purificado fue mantenido a -20°C hasta su amplificación.

3.2 PCR tiempo final con partidores de ADN kinetoplastídico de *T. cruzi* (PCR-XD)

Para evaluar la presencia de *T. cruzi* mediante PCR Tiempo Final (PCR-XD) en las muestras en estudio, se utilizaron partidores que alinean con ADN kinetoplastídico generando una banda específica de 330 pb. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µl de las muestras de purificados de XD; 1 µl de los partidores 121 (5'-AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA3') y 122 (5'GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') a una concentración de 10 µM; 4 µl de buffer de Taq polimerasa Sistema Gotaq® Flexi ADN Polimerase Promega; 25 mM de MgCl₂ (2 µl); 0,4 µl (10 mM) de dNTPs; 1 U Taq polimerasa (0,2 µl) y 6,4 µl de agua destilada estéril libre de nucleasas, para un volumen final de 20 µl. La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador TC-412 (Techne). El programa de amplificación constó de dos ciclos de 98°C por 1 minuto y 64°C por 2 minutos, seguido por 33 ciclos de 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto; para finalizar con un ciclo de extensión de 72°C por 10 minutos, finalizado el proceso la temperatura se mantuvo a 4°C. Luego 10 µl de los amplificadas se sometieron a electroforesis durante aproximadamente 60 min a 113 volts en gel de agarosa al 2% en buffer Tris Borato EDTA 1x teñido con 10 µl de bromuro de etidio (10 µg/ml). Se utilizó como control positivo de reacción, ADN de paciente con parasitemia confirmada mediante XD y PCR y, como control negativo, deyecciones purificadas de XD de paciente no chagásico. En todos los geles fue incluido un marcador de 100 pb (Blench Top 100bp ADN Ladder) y se tomó una fotografía de registro.

3.3 PCR Tiempo Real

3.3.1 Cuantificación de ADN purificado mediante fluorometría

Con el fin de determinar la cantidad de ADN total presente en las muestras de XD de los 50 pacientes en estudio, se tomaron 10 µl de purificado de cada uno de los periodos a evaluación (30, 60 y 90 días), se homogeneizaron correctamente y se determinó la concentración de ADN (ng/ul), utilizando el kit de cuantificación AccuBlue™ High Sensitive dsDNA Quantitation (Biotium, Inc.) en el equipo de PCR Tiempo Real Mx3000P™ Stratagene (Agilent Technologies). Con este fin, para 75 reacciones, se tomó 3000 µl de AccuBlue™ High Sensitive dsDNA Quantitation Solution y se mezclaron con 30 µl AccuBlue™ High Sensitive Enhancer. A cada tubo se le adicionó 40 µl de la mezcla y 2 µl de ADN purificado. Los tubos fueron incubados en oscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos al interior del equipo de PCR Tiempo Real

y posteriormente la fluorescencia fue leída con filtro FAM (485 nm de excitación y 530 nm de emisión). Los resultados se analizaron con el software MxPro v4.1 (Agilent Technologies).

Con los nueve dsDNA provistos por el kit (0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ng/μl dsDNA), se generó una curva estándar que permitió determinar la concentración de ADN en cada una de las muestras de deyección purificada en estudio. Cada reacción se realizó en triplicado para reducir la variabilidad inter-reacción. Como controles se utilizó agua libre de nucleasas y mix de cuantificación (Bravo *et al.*, 2012).

3.3.2 Detección y cuantificación de *T. cruzi* mediante PCR Tiempo Real en deyecciones de XD

Para obtener ADN parasitario y generar la curva estándar para la cuantificación mediante qPCR, se utilizó un “stock” de formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuén (clasificación DTU TcVI) obtenidas de cultivo axénico, gentilmente aportados por el Dr. Juan Diego Maya, del Programa de Farmacología del ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La curva estándar se creó a partir de una concentración conocida de ADN de *T. cruzi*, realizando diluciones seriadas (1/10) en buffer elución AE del kit de extracción QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen). Se estimó un rango dinámico de 7 puntos que fluctúan entre 10^5 a 10^{-1} parásitos/ml. Todos los cálculos se estimaron considerando que cada célula de *T. cruzi* posee 200 fg de material genético (Duffy *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2008; Kooy *et al.*, 1989).

Paralelamente, se utilizó como control interno exógeno (CIE) de qPCR, utilizando parte de una secuencia del cromosoma 12 (X12). Con este fin, se adicionó a cada una de las muestras de deyección en estudio, previo al proceso de extracción, 20 ng de ADN equivalente genómico humano (Jena Bioscience®) de individuo sin enfermedad de Chagas (Bravo *et al.*, 2012). El CIE fue diseñado para descartar casos de falsos negativos debido a ausencia de ADN en la muestra evaluada, ya sea por problemas en la extracción o inhibición en la reacción de qPCR. De este modo, CIE es útil como control de extracción de ADN y como control de reacción de qPCR.

La presencia y cuantificación de *T. cruzi* fue determinada mediante qPCR aplicando el sistema de detección TaqMan® en termociclador Mx3000P™ Stratagene (Agilent Technologies) según las condiciones sugeridas por el fabricante y utilizando los partidores de ADN satelital Cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTCGA-3'), Cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') a una concentración de 0,5 μM (Piron, 2007) y sonda de ADN satelital Cruzi 3

(5'-CACACACTGGACACCAA-3') en concentración de 0,2 μM (Piron, 2007; Schijman, 2011). Se trabajó en campana de flujo laminar para evitar el exceso de luz directa sobre los reactivos durante el procedimiento. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 2 μl de la muestra a investigar, 10 μl de Brilliant Multiplex QPCR Master Mix (Stratagene), 0,5 μl de una solución 1:500 de Reference Dye (ROX), 1 μl de cada uno de los oligonucleótidos satelitales Cruzi 1 y Cruzi 2, 0,4 μl de la sonda Cruzi 3, 0,2 μl de BSA (100X) y 4,9 μl de Molecular Biology Grade Water (Mo Bio) para un volumen final de reacción de 20 μl .

Adicionalmente se hizo un "pool" de ADN de todas las muestras de XD en cada período, utilizando 10 μl de cada una de los purificados de ADN para cada período correspondiente, para obtener una estimación de cuantos parásitos podríamos encontrar en los 3 momentos de evaluación en muestras de XD.

Para X12, se utilizaron los partidores N1X12 forward (5'-AGCTGGCTAGACTGTCAT-3 ') y N2X12 reverse (5'-CTTTGCCGTTGAAGCTTG-3') a una concentración de 1 μM (Bravo *et al.*, 2012) y la sonda N3X12 (5'-TGGGACTTCAGAGTAGGCAGATCG-3') a una concentración de 0,4 μM (datos originales del laboratorio no publicados). La mezcla de reacción se compuso de 2 μl de la muestra a investigar, 10 μl de Brilliant Multiplex QPCR Master Mix (Stratagene), 0,5 μl de una solución 1:500 de Reference Dye (ROX), 2 μl de N1X12, 2 μl de N2X12, 0,8 μl N3X12, 0,2 μl de BSA (100X) y 2,5 μl de Molecular Biology Grade Water (Mo Bio) para un volumen final de reacción de 20 μl . Para la curva estándar de X12, se prepararon diluciones seriadas 1/5 de ADN genómico humano en buffer elución AE, con una cantidad conocida de X12.

Las reacciones de qPCR para *T. cruzi* y X12, se realizaron en el mismo ensayo y con el mismo perfil térmico, que consistió en 10 minutos de pre-incubación a 95°C y 40 ciclos de amplificación (95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto). El registro de la fluorescencia emitida se realizó a 60°C al final de cada ciclo. Los resultados se analizaron con el software MxPro v4.1 (Agilent Technologies).

Todos los valores obtenidos de la cuantificación de *T. cruzi* de las muestras de XD en el equipo de qPCR, fueron posteriormente multiplicados por el factor de corrección 0.6 que corresponde al valor presente en la deyección de los 14 triatominos, que se estimó como un volumen de 100 μl y que se encuentra diluido en los 500 μl de buffer PBS. Obteniendo así el valor absoluto de parásitos presentes en el XD y no expresado en parásitos/ml como en la curva estándar, todo lo anterior permite una mayor importancia diagnóstica y una mejor interpretación de la información obtenida.

3.3.3 Controles de Reacción

3.3.3.1. Controles para *T. cruzi*

3.3.3.1.1 Control negativo: se utilizó ADN de XD de paciente no chagásico confirmado mediante serología (IFI y ELISA IgG) y evaluado con anterioridad en equipo de qPCR.

3.3.3.1.2. Controles positivos: ADN de XD de individuo con enfermedad de Chagas con parasitemia confirmada mediante XD, PCR y evaluado con anterioridad en equipo de qPCR. Adicionalmente se utilizó un control positivo de purificado de ADN de *T. cruzi* (AmpliRun®*Trypanosoma cruzi* Control, Vircell, S.L.), diluido a una concentración de 20.000 p/ml.

3.3.3.1.3 Control Mix: 20 µl de mix de reacción para *T. cruzi* (no contiene muestra en estudio).

3.3.3.1.4. Control Agua: 2 µl de agua libre de nucleasas (Mo Bio) (reemplaza muestra estudio).

Los controles 3.1.3 y 3.1.4, son útiles para evaluar contaminación en la preparación del mix de reacción o reacción inespecífica de qPCR.

3.3.3.2. Controles para X12:

3.3.3.2.1. Control negativo: ADN de XD de individuos no chagásico, condición determinada mediante serología convencional (IFI y ELISA IgG) y evaluado con anterioridad en equipo de qPCR.

3.3.3.2.2. Control positivo: ADN de XD de individuo chagásico, al cual se agregó previo al proceso de extracción, 44 ng de ADN equivalente genómico humano, evaluado con anterioridad en equipo de qPCR.

3.3.3.2.3. Control Mix: 20 µl de mix de reacción para X12 (no contiene muestra en estudio).

3.3.3.2.4. Control Agua: 2 µl de agua libre de nucleasas (Mo Bio) (reemplaza muestra estudio).

Estos dos últimos controles, al igual que *T. cruzi*, son útiles para evaluar contaminación en la preparación del mix de reacción o reacción inespecífica de qPCR.

Todas las reacciones de las muestras en estudio, incluidos los controles, se realizaron en duplicado. Por otra parte, las curvas estándar de *T. cruzi* y X12 se realizaron en triplicado, para reducir al mínimo la variabilidad entre tubos.

4. Análisis estadístico

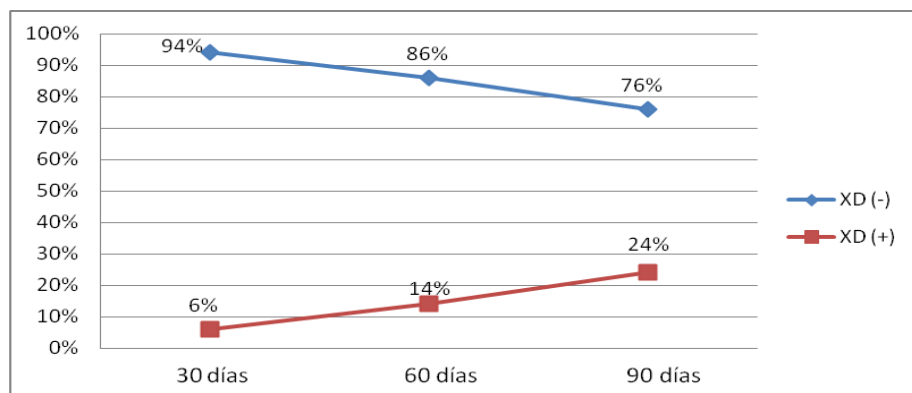
El análisis descriptivo se realizó a través de tablas y porcentajes. Las comparaciones de las técnicas diagnósticas se hicieron a través de las pruebas de Cochran (p-value ≤ 0.05) y Mc Nemar (p-value ≤ 0.05).

RESULTADOS

1. Xenodiagnóstico

La observación microscópica de las muestras, permitió determinar una positividad del 6%, 14% y 24% a los 30, 60 y 90 días, respectivamente (Gráfico 1). Al mismo tiempo, se realizó una estimación cuantitativa de las formas parasitarias/campo microscópico, utilizando la escala de cruces descrita en la sección 3.1. (Anexo 3)

Gráfico 1. Positividad de la observación microscópica, de las 150 muestras de deyecciones obtenidas mediante XD en los 3 períodos de estudio.



Por otro lado, la escala de cruces tiene una relación directa entre la observación microscópica y la cuantificación parasitaria mediante qPCR-XD, pues en todos los casos en que fue posible visualizar *T. cruzi* en el campo microscópico, fue posible cuantificarlo mediante qPCR-XD en más de un parásito por XD total.

2. PCR-XD

El PCR aplicado en las 150 muestras de deyección, obtenidas de XD y posteriormente purificadas en los 3 períodos en estudio, evidencia una positividad del 68%, 74% y 76% a los 30, 60 y 90 días, respectivamente (Gráfico 2; Anexo 4). A cada una de las muestras se les fotografió para obtener un registro (Figura 1).

Gráfico 2. Positividad de PCR-XD de 150 muestras de deyección obtenidas mediante XD y posteriormente purificadas en los tres períodos de estudio.

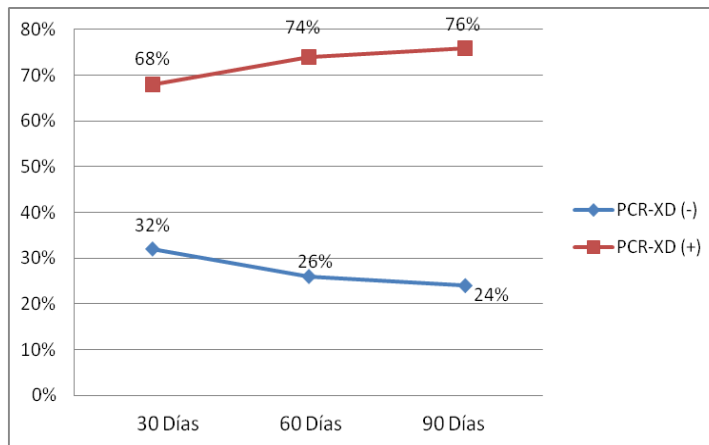
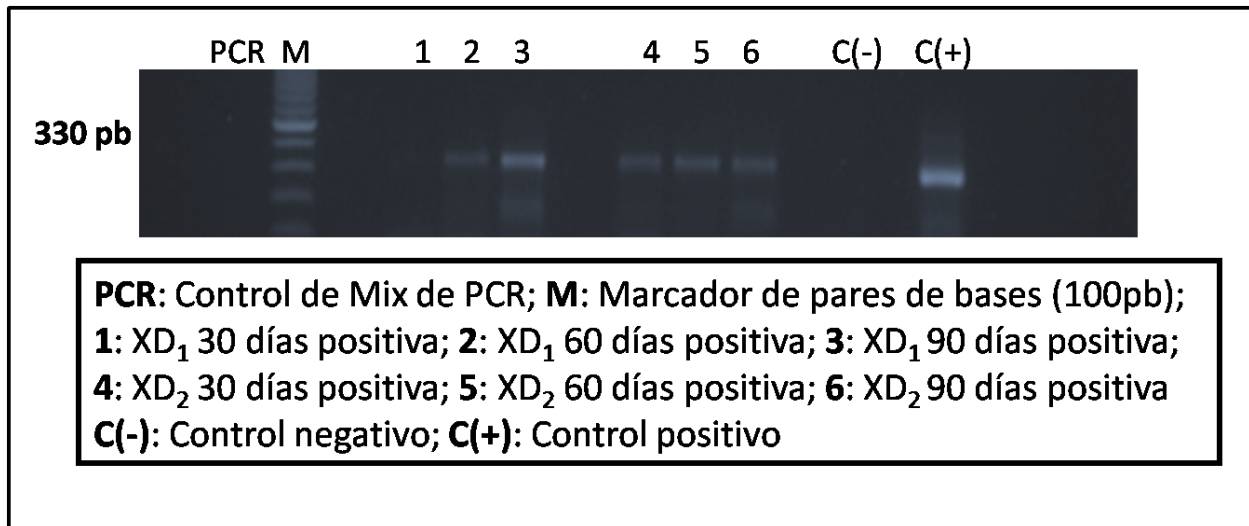


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa (2%) de los productos de *T. cruzi* amplificados por los primers kinetoplastídicos 121-122 que generan una banda específica de 330 pb en muestras de deyecciones de XD aplicados en individuos con enfermedad de Chagas crónica.



3. Cuantificación ADN total en muestras de deyección obtenidas mediante XD en fluorímetro incorporado en equipo de PCR Tiempo Real.

La cuantificación de ADN total fue realizada con el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation en el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene. Este análisis cuantitativo determinó que la cantidad máxima de ADN total presente en las muestras de deyección obtenidas mediante XD en los 50 pacientes, fue de **0,26 ng/μl** (Figura 2, Gráfico 4, Anexo 5).

Figura 2. Curva estándar de cuantificación de ADN total mediante el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium) con muestras en estudio.

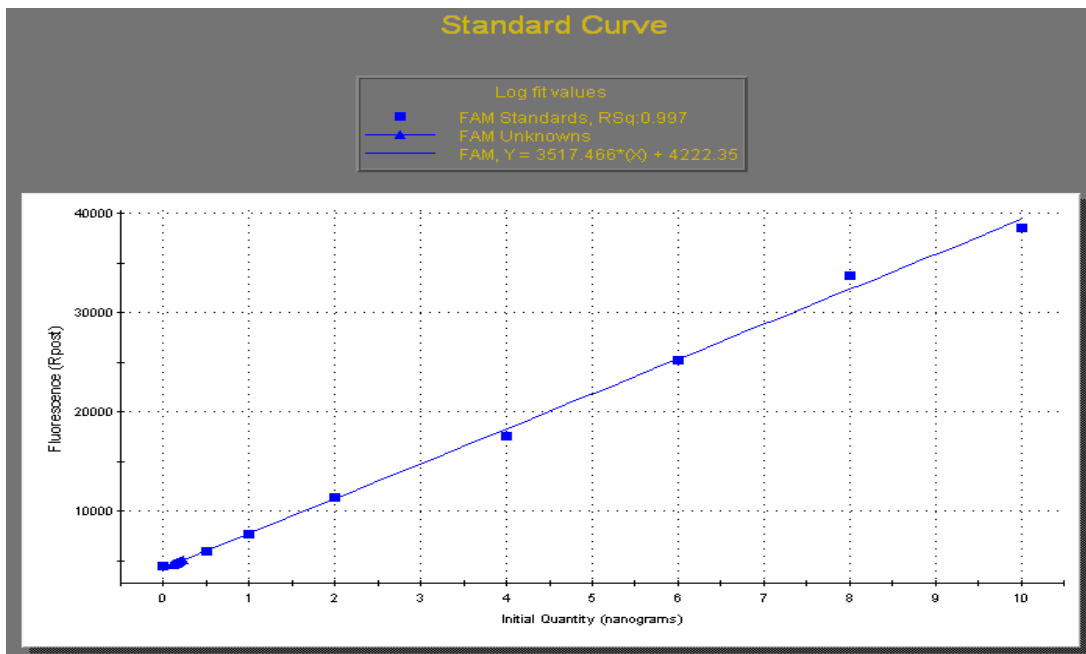
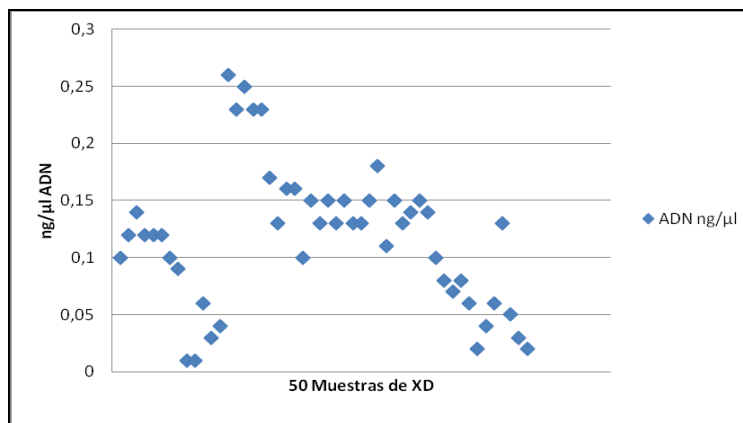


Gráfico 4. Resultados de la cuantificación de ADN total en 50 muestras de deyección obtenidas mediante XD.



4. Cuantificación de *T. cruzi* mediante PCR Tiempo Real en muestras de deyecciones obtenidas mediante XD

4.1 Cuantificación de ADN parasitario y ADN humano

Para la obtención de la curva estándar de *T. cruzi*, se cuantificó el ADN parasitario total presente en purificados de ADN de alícuotas de epimastigotes de cultivo axénico, utilizando el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit en el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene. Se estableció que en una de las alícuotas había 2 ng/μl de ADN parasitario (Figura 3) y sabiendo según la bibliografía disponible que 1 parásito de *T. cruzi* contiene 0,0002 ng (200 fg) de ADN en total (Duffy *et al.*, 2009; Ferrer *et al.*, 2008; Kooy *et al.*, 1989), podemos establecer que en un volumen de 100 μl obtendríamos 1×10^6 parásitos/ml. A partir de esa concentración se hicieron diluciones seriadas 1/10 en buffer AE y se obtuvieron los puntos de la curva necesarios para la cuantificación de las muestras. El rango dinámico se estableció entre 1×10^5 y 1×10^{-1} p/ml, estando cada punto de la curva en un volumen de 100 μl.

Por otra parte, la cuantificación de un “pool” de ADN humano sanguíneo de pacientes no chagásicos se llevó a cabo en condiciones similares, estableciendo que la cantidad de ADN presente fue de 2,79 ng/μl (Figura 4) y, posteriormente, se hicieron diluciones seriadas 1/5 en buffer AE, para generar una curva estándar para detectar y cuantificar el CIE de las muestras de XD, con rangos entre 2,79 ng/μl y 0,004 ng/μl de ADN humano.

Figura 3. Curva estándar de cuantificación de ADN total de *T. cruzi* mediante el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium), en alícuota de cultivo axénico.

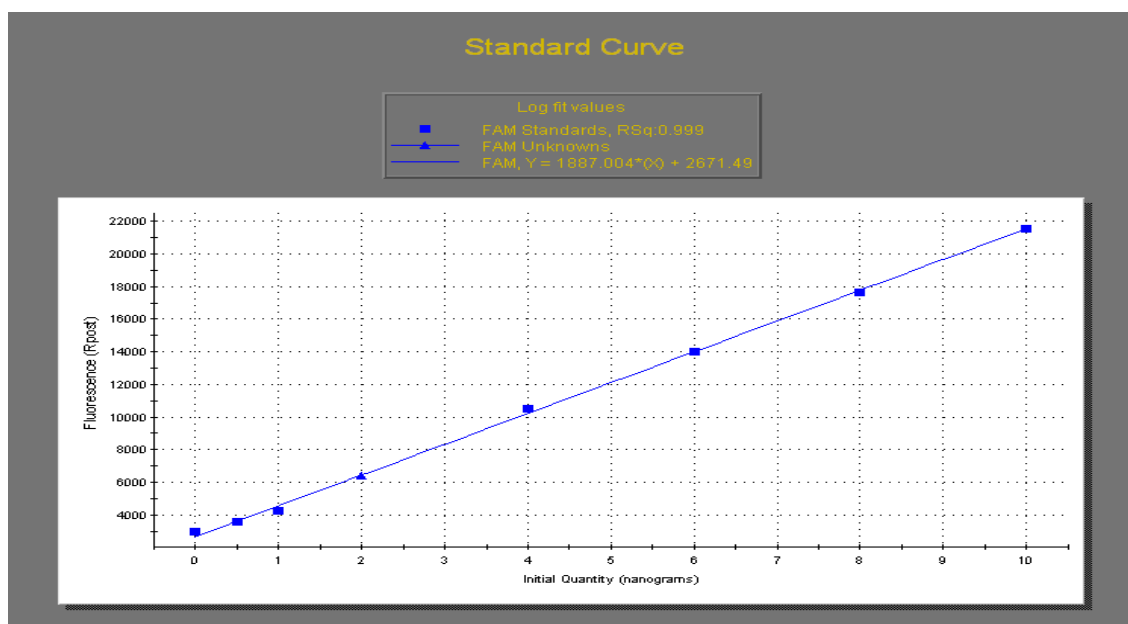
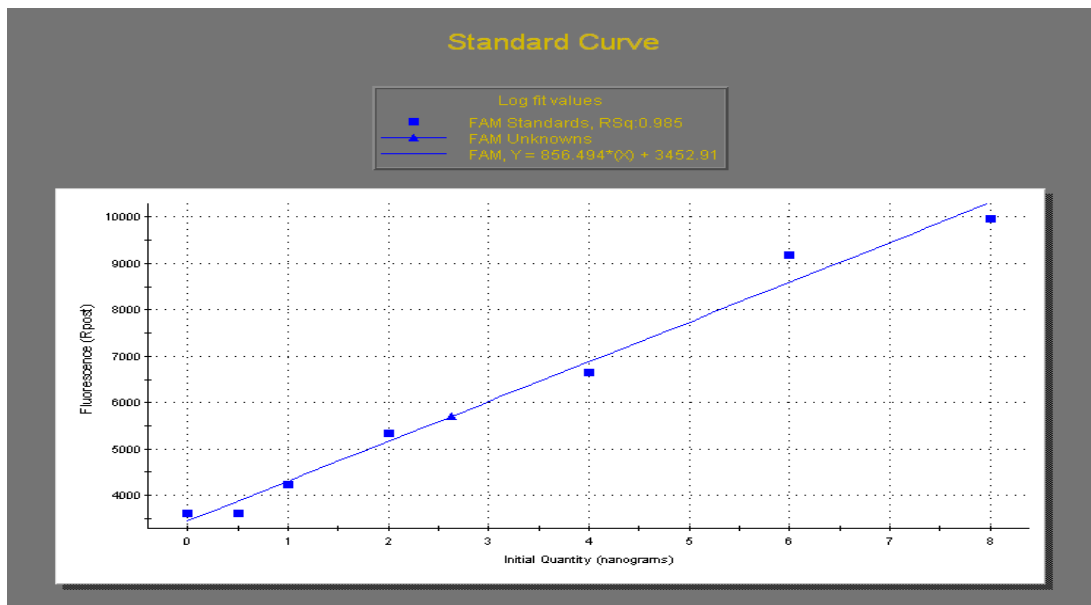


Figura 4. Curva estándar de cuantificación de ADN total mediante el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).



4.2 qPCR-XD con sistema de detección TaqMan® para *T. cruzi* y X12.

4.2.1 Curvas estándar para qPCR-XD.

Luego de la obtención de los puntos iniciales y sus diluciones, las curvas se evaluaron en el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene evaluando: eficiencia (Eff), que debe ser cercana a 100%, pendiente de la curva (Y) que debe ser aproximada a -3.3 que corresponde a la diferencia de ciclos entre cada uno de los puntos de la curva y, finalmente, el coeficiente de determinación (RSq o R^2), que para considerarse óptimo, debe ser >0.98 . Todos los puntos de la curva amplificaron tanto para *T. cruzi* como X12 (Figuras 5 y 6) y con los resultados ya evaluados se decidió que todos los valores de las muestras desconocidas que se encontraron en el rango de $<0,1$ parásitos fueron informados como (+) no cuantificables y los valores que se encuentren entre $>0,1$ a 1 parásitos fueron informados como <1 parásito en XD entregando solo el valor cualitativo de positividad, no el valor absoluto debido a que dichos puntos no son reproducibles para todos los ensayos, requisito fundamental para una cuantificación lo más exacta posible.

Usando esta metodología se evaluaron las muestras de XD de los 50 pacientes en los 3 períodos en estudio, resguardando que las 3 muestras por individuo estuviesen siendo evaluadas en el mismo ensayo tanto para la cuantificación de *T. cruzi* como para la evaluación de X12 y todos sus respectivos controles, realizando un total de 17 ensayos para la evaluación de las 150 muestras en estudio.

Figura 5. Curva de Amplificación de los 6 estándares de ADN de *T. cruzi* generados mediante qPCR con sistema de detección TaqMan®. Rango de cuantificación entre los puntos que representan el ADN equivalente a 1×10^5 parásitos/ml y el ADN equivalente a 1×10^0 parásitos/ml.

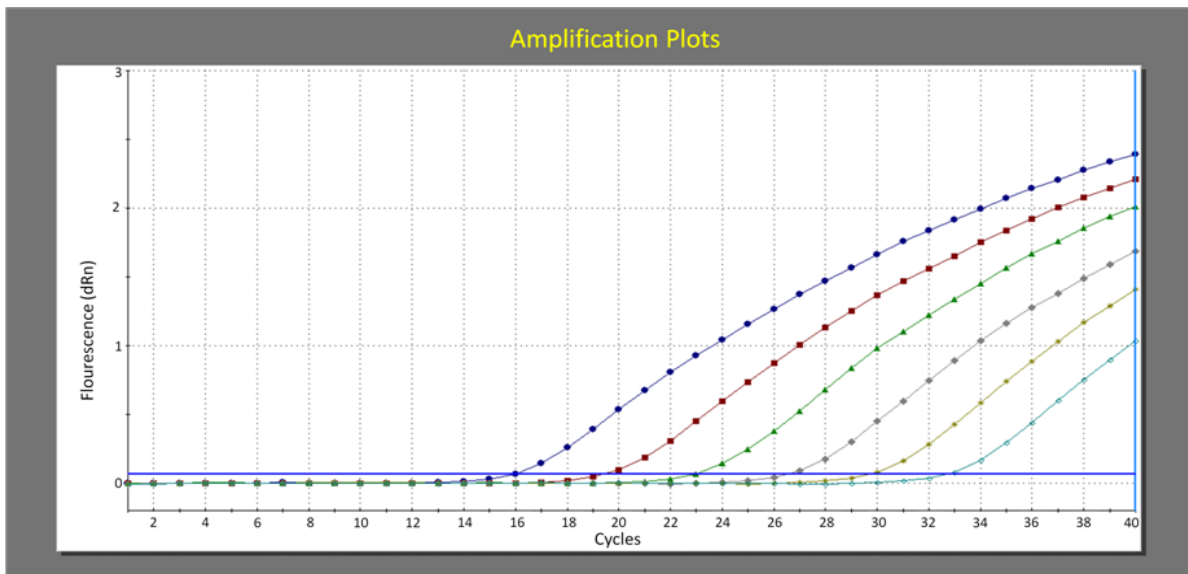
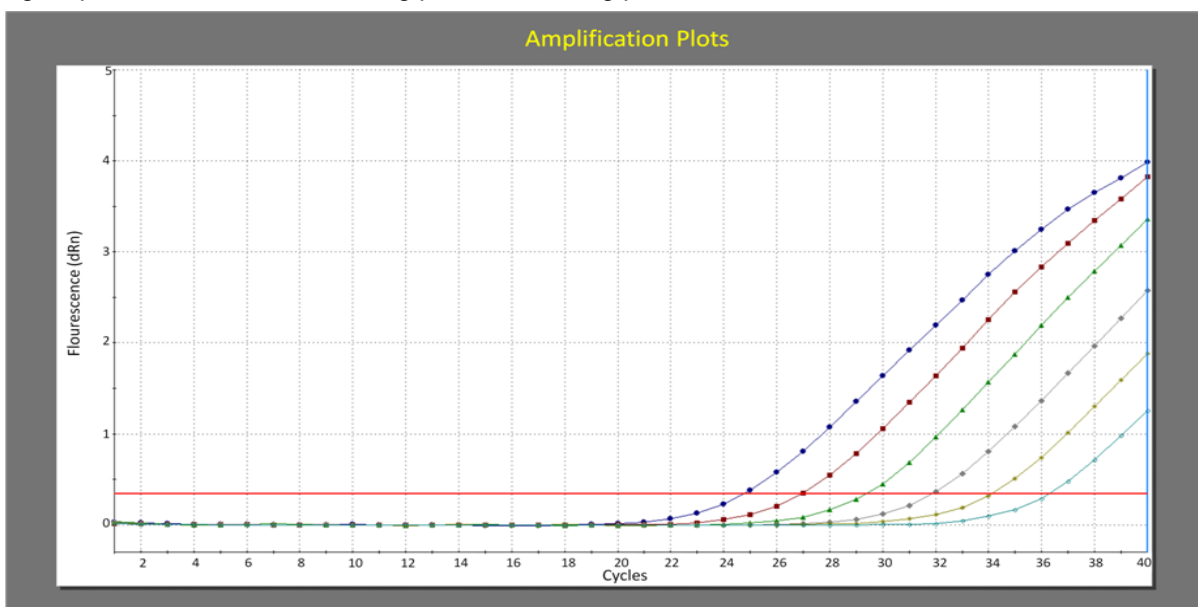


Figura 6. Curva de Amplificación de los 6 estándares de CIE con sistema de detección TaqMan®, con rangos que oscilan entre los 2,79 ng/ μ l a los 0,004 ng/ μ l de ADN humano.



Las curvas estándar para *T. cruzi* presentó un R^2 : 0.999, Y: -3.346 y Eff: 99.0% y la curva de X12 presentó un R^2 : 0.997, Y: -3.266 y Eff: 102.4%, ambos rangos aceptables para cuantificar las muestras de XD (Figuras 7 y 8).

Figura 7. Curva Estándar de *T. cruzi* para la reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.

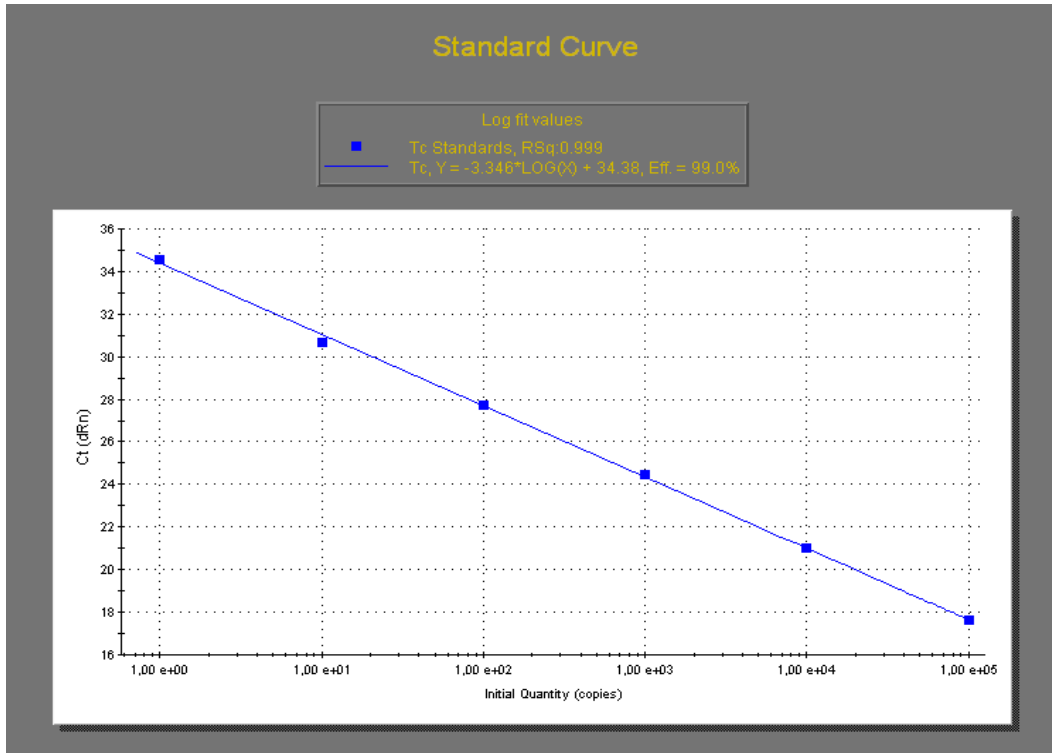
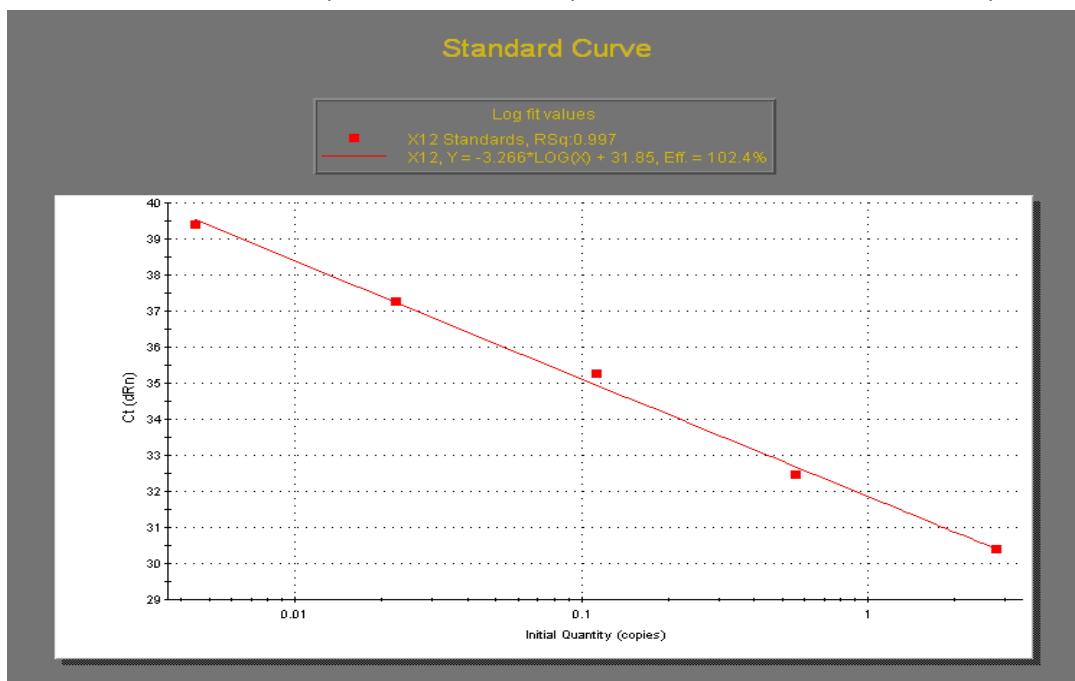


Figura 8. Curva Estándar de X12 para la reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.



4.2.2 CIE en muestras de XD en qPCR

En todas las muestras de XD se evidenció la amplificación de X12 (Ct: 31,8) Figura 9, por lo cual se descartaron problemas en el proceso de extracción (exceso de pérdida de material genético), reacción inespecífica y/o de inhibición de qPCR-XD, además, el control positivo a X12 evidenció amplificación. Se obtuvieron los promedios de los Ct y la cuantificación de ADN humano de las muestras (Tabla 2).

Figura 9. Curva de cuantificación de X12 para la reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®, en muestras de XD con CIE incorporado.

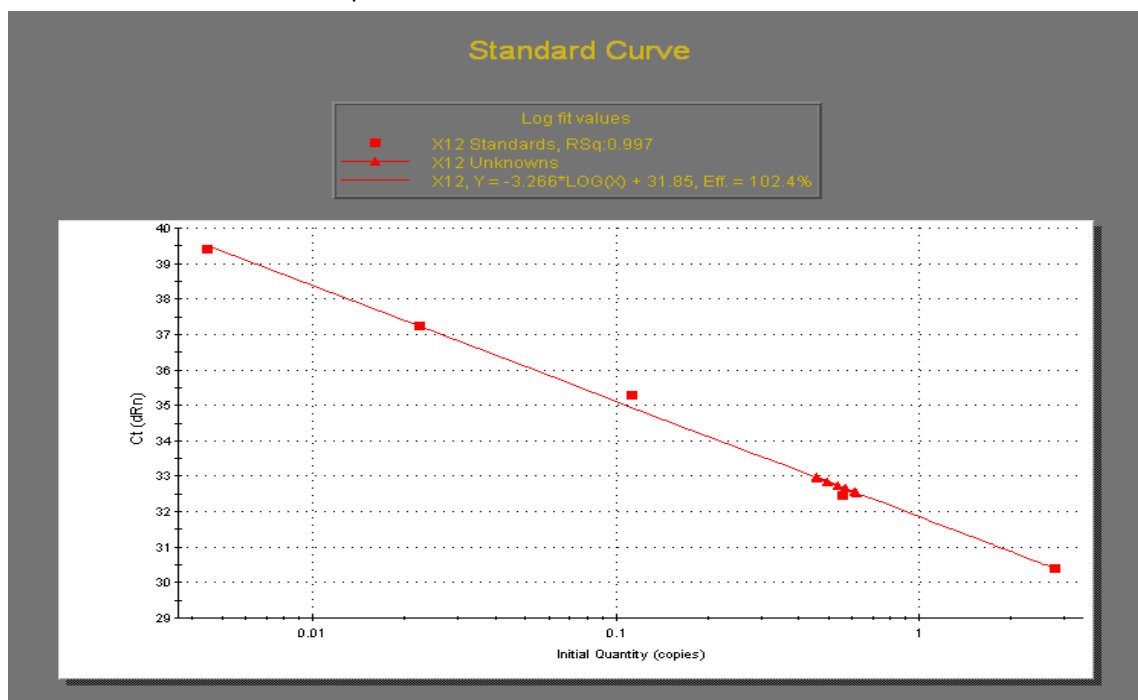


Tabla 2. Resultados de qPCR-XD promedio de CIE en las 150 muestras de XD.

qPCR-XD X12 30 días ng/μl	Ct	qPCR-XD X12 60 días ng/μl	Ct	qPCR-XD X12 90 días ng/μl	Ct
0,34	31,71	0,33	31,8	0,33	31,7

Los controles negativos, el control agua y el control mix tanto para X12, no evidenciaron amplificación en ninguna de las determinaciones en el equipo de qPCR, descartándose problemas de contaminación de los reactivos y de las muestras.

4.2.3 Muestras de XD en qPCR.

El control negativo, agua y mix no evidenciaron amplificación para *T. cruzi*, por otra parte, el control positivo que correspondía a ADN de XD de un paciente con enfermedad de Chagas crónica, amplificó con un Ct de 27,28 con una cuantificación correspondiente a 76,5 p/ml. El control comercial de ADN de *T. cruzi* (AmpliRun®), diluido a una concentración de 20.000 p/ml amplificó en el Ct de 18,85.

En los ensayos, 6 (12%) de las muestras en el período de 30 días no evidenciaron amplificación, a los 60 días 2 (4%) no amplificaron y, a los 90 días, solo 1 (2%) no lo hizo, descartándose en todas ellas pérdida de material genético o inhibición de la reacción a través del CIE. La no amplificación de estas muestras se expresa como No Ct y se refiere a que la muestra es negativa para *T. cruzi* (Tabla 3).

El resto de las muestras amplificaron, Figura 10, con gran variabilidad en lo cuantificado y una multiplicación exponencial a medida que avanzamos en los periodos de evaluación. Por otro lado, se evidencia que al evaluar cada una de las 50 muestras del período correspondiente (Tabla 3), los Ct van disminuyendo en cada periodo, lo que indica mayor cantidad de parásitos en la muestra.

Figura 10. Curva de cuantificación de muestras de XD de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.

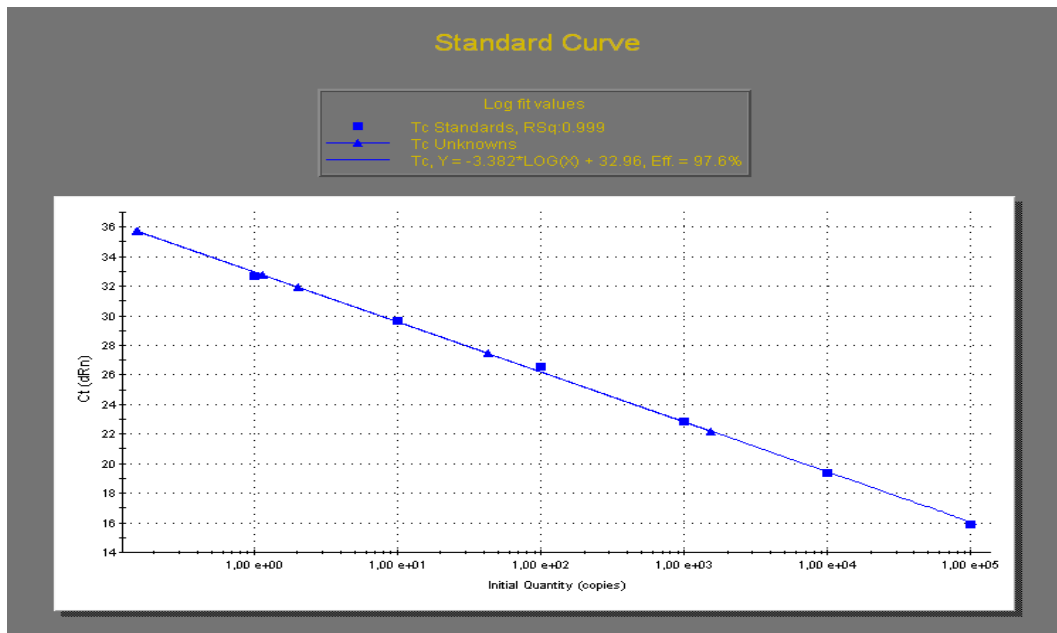


Tabla 3. Resultados de qPCR-XD de las 150 muestras de XD en estudio, indicados en parásitos totales.

Parásitos en XD						
	30 días	Ct	60 días	Ct	90 días	Ct
1	<1	34,96	24,63	29,51	24,69	29,50
2	<1	35,61	4,11	32,33	7,05	31,48
3	<1	37,48	4,74	32,10	27,64	29,33
4	(+)	36,71	<1	37,11	<1	35,87
5	1,24	34,76	(+)	39,32	1,12	34,92
6	<1	38,30	(+)	39,70	1,42	34,55
7	(+)	36,66	(+)	35,97	<1	32,82
8	(+)	35,77	25,54	27,52	902,4	22,28
9	(+)	37,65	(+)	35,81	1,21	31,99
10	(+)	39,69	<1	37,23	<1	34,99
11	(+)	38,76	<1	35,46	(+)	37,96
12	(+)	39,54	<1	35,54	<1	35,34
13	(+)	37,97	No Ct	No Ct	(+)	37,75
14	(+)	39,88	<1	36,53	(+)	38,84
15	No Ct	No Ct	1,15	33,61	(+)	37,90
16	(+)	36,54	103,8	26,55	494,4	24,43
17	(+)	38,19	<1	33,95	64,8	27,32
18	<1	36,31	(+)	37,13	1,56	32,62
19	(+)	36,35	No Ct	38,45	<1	32,81
20	(+)	37,02	(+)	36,31	<1	31,63
21	(+)	34,40	(+)	36,52	(+)	34,01
22	(+)	38,32	<1	36,40	<1	33,86
23	(+)	30,58	(+)	37,06	<1	34,79
24	<1	33,46	2,19	31,98	34	27,92
25	(+)	35,12	<1	33,68	(+)	34,87
26	(+)	37,74	<1	33,86	(+)	35,32
27	(+)	36,44	<1	34,06	<1	34,82
28	<1	36,18	<1	34,40	<1	35,69
29	(+)	36,93	1,14	32,75	<1	35,49
30	<1	35,98	97,32	25,82	620,4	22,93
31	20,86	28,97	7,49	30,42	253,62	25,43
32	(+)	37,44	(+)	38,01	<1	33,55
33	(+)	36,78	(+)	37,26	<1	33,55
34	(+)	37,06	<1	34,87	<1	32,18
35	(+)	38,71	(+)	35,51	<1	34,80
36	(+)	35,91	(+)	36,44	(+)	35,56
37	(+)	38,28	7,92	28,45	<1	32,92
38	(+)	37,04	<1	31,84	<1	34,30
39	(+)	36,62	<1	34,48	(+)	35,05
40	14,80	29,70	26,58	28,81	130,2	26,39
41	7,53	30,73	3,99	31,69	57,27	27,64
42	No Ct	No Ct	(+)	37,93	<1	35,24
43	No Ct	No Ct	4,81	30,82	102,06	26,41
44	No Ct	No Ct	<1	35,06	<1	33,97
45	(+)	39,42	(+)	38,49	No Ct	No Ct
46	(+)	38,91	(+)	37,01	<1	33,80
47	No Ct	No Ct	(+)	39,06	<1	33,60
48	<1	35,97	<1	34,9	<1	35,91
49	No Ct	No Ct	(+)	36,93	<1	35,64
50	(+)	37,62	(+)	37,17	7,05	29,88

(+)= Valores menores a 0,1 parásitos en XD, positivos pero no cuantificables
 <1 = Valores mayores a 0,1 y menores a 1 parásito en XD.

La cuantificación del “pool” de XD de los 50 pacientes por cada período, evidenció multiplicación exponencial a medida que avanzan los periodos de evaluación y la disminución de los Ct debido a la mayor cantidad de parásitos presentes en la muestra (Tabla 4).

Tabla 4. “Pool” de XD de las 50 muestras a los 30, 60 y 90 días.

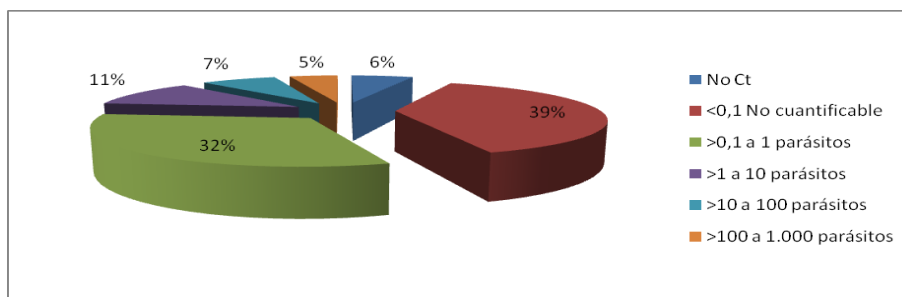
30 días		60 días		90 días	
Parásitos	Ct	Parásitos	Ct	Parásitos	Ct
1,48	33,48	5,19	31,20	48,45	28,19

En la Tabla 5, podemos evidenciar que 9 (6%) de las muestras no amplificaron en ninguno de los 3 períodos, descartándose pérdida de ADN de la muestra por el CIE. 58 muestras (38,7%) tienen valores menores a 0,1 parásitos y 48 (32%) entre los rangos de >0,1 a 1 parásito. A medida que avanzan los periodos de evaluación, la cantidad de parásitos aumenta en las muestras, encontrando 17 (11,3%) muestras entre los rangos de 1 a 10 parásitos por XD. En los dos rangos superiores no se detectaron muestras en estudio. Por el contrario, fue posible detectar muestras que se acercan a los 1000 parásitos por XD (Gráfico 5).

Tabla 5. Rangos de parásitos de XD de las 150 muestras en qPCR-XD

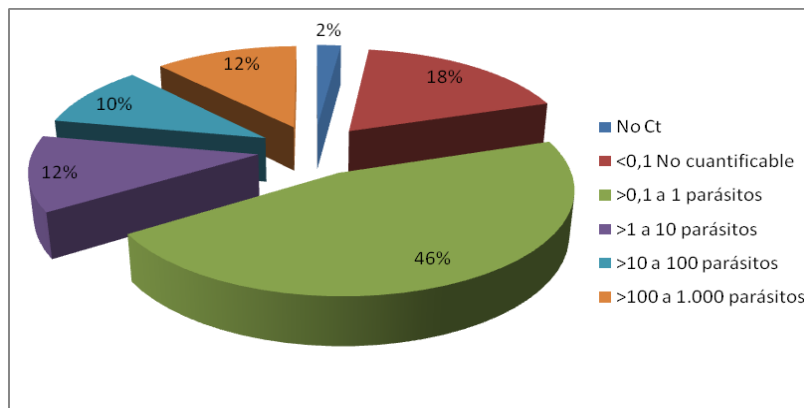
Rangos <i>T. cruzi</i> en XD	30 días	%	60 días	%	90 días	%	TOTAL	%
No Ct	6	12	2	4	1	2	9	6
<0,1 No cuantificable	31	62	18	36	9	18	58	39
>0,1 a 1	9	18	16	32	23	46	48	32
>1 a 10	2	4	9	18	6	12	17	11
>10 a 100	2	4	4	8	5	10	11	7
>100 a 1.000	0	0	1	2	6	12	7	5
>1.000 a 10.000	0	0	0	0	0	0	0	0
>10.000 a 100.000	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	50	100	50	100	50	100	150	100

Gráfico 5. Rangos de parásitos de XD de las 150 muestras a los 30, 60 y 90 días expresados en porcentaje.



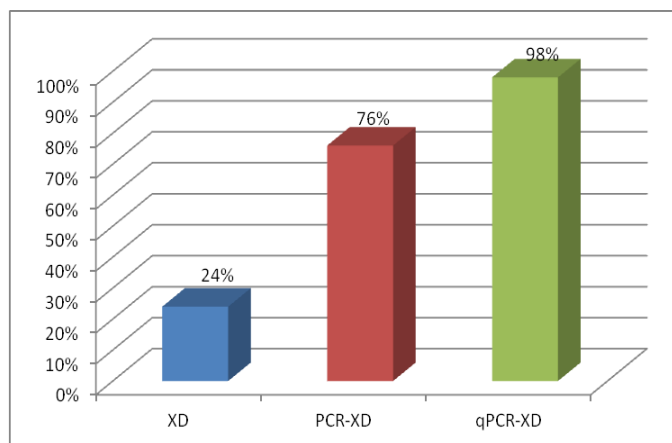
Al expresar la cuantificación de las muestras a los 90 días, tenemos que el 64% de ellas presentan valores de parásitos menores a 1 parásito en muestra de XD (Gráfico 6 y Anexo 6).

Gráfico 6. Cuantificación de las muestras de XD a tiempo final, 90 días, expresado en porcentaje.



Por otro lado al expresar la positividad final, es decir, a los 90 días después de realizado el XD, se estableció la positividad de las 3 pruebas diagnósticas (Gráfico 7).

Gráfico 7. Positividad FINAL, expresado a los 90 días del XD, en las 3 pruebas diagnósticas.



En todos los períodos hubo concordancia del 100% entre las 3 técnicas, excepto a los 30 días donde la concordancia alcanzó el 91% entre PCR-XD y qPCR-XD. El 52% de las muestras cuantificadas mediante qPCR presentó aumento progresivo de la cantidad de parásitos de los 30 a los 90 días.

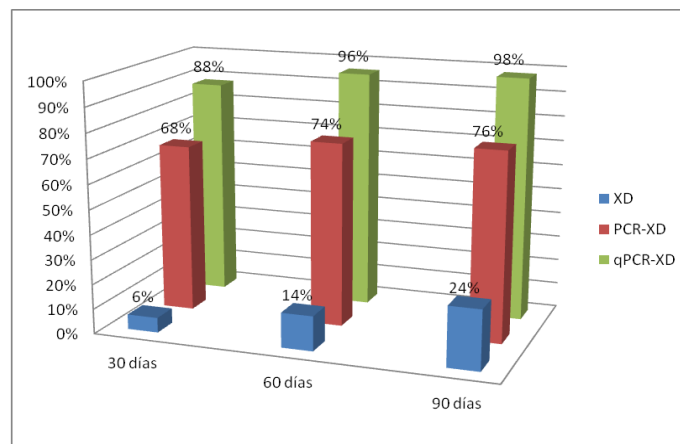
ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de positividad de las 3 pruebas diagnósticas se detallan en la Tabla 6 y Gráfico 8.

Tabla 6. Positividad de las muestras de XD en los 3 períodos de evaluación.

Período	POSITIVIDAD		
	XD	PCR-XD	qPCR-XD
30 días	6%	68%	88%
60 días	14%	74%	96%
90 días	24%	76%	98%

Gráfico 8. Porcentaje de positividad de las 3 técnicas diagnósticas.



Utilizando la prueba de Cochran se determinó que las pruebas diagnósticas XD, PCR-XD y qPCR-XD, son estadísticamente significativas para los tres periodos de evaluación, es decir la positividad aumenta al transcurrir los 3 períodos de evaluación: 30 días: $Q=62.318$; $p\text{-value}=0.001$, 60 días: $Q=64.33$; $p\text{-value}=0.001$, 90 días: $Q=58.541$; $p\text{-value}=0.001$.

Al realizar las comparaciones múltiples utilizando las pruebas de Mc Nemar y Binomial, se determinó que a los 30 días no existen diferencias significativas entre la positividad de los exámenes de PCR-XD y qPCR-XD ($p\text{-value}=0.063$), pero a la vez la positividad de ambas es mayor que el XD. Por otra parte, las comparaciones de la positividad de PCR-XD y qPCR-XD a los 60 y 90 días de estudio, indican que las diferencias son estadísticamente significativas ($p\text{-value}=0.003$), en otras palabras, qPCR-XD es la técnica de elección por sobre XD y PCR-XD, debido a que obtenemos la positividad y la cuantificación de las muestras en el menor periodo posible.

DISCUSIÓN

En la actualidad, no existe consenso internacional sobre los parámetros de evaluación de eficacia de los fármacos administrados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica (Rassi *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2011), los que en general incluyen evaluación clínica, electrocardiográfica, radiológica, parasitológica y serológica (Rassi *et al.*, 2005). Este estudio contribuye al conocimiento de esta problemática con la evidencia de la mayor precocidad en el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* mediante qPCR-XD en comparación con las técnicas de XD y PCR-XD, resultado original y que puede modificar los actuales protocolos de evaluación quimioterapéutica para esta fase de la enfermedad.

Las muestras biológicas utilizadas en este estudio (ADN extraído de deyecciones de *T. infestans* utilizados en el XD), representan una gran ventaja respecto al ADN de *T. cruzi* extraído de sangre periférica, debido a que el vector biológico amplifica en forma natural *T. cruzi* en su intestino medio previo al estudio parasitológico mediante PCR-XD o qPCR-XD, pudiendo pesquisar parasitemias más bajas que la muestra ADN proveniente de sangre periférica. No obstante esta importante ventaja, la carga parasitaria determinada mediante qPCR-XD no puede ser extrapolada a la carga de *T. cruzi* circulante en el individuo infectado, debido a factores como: amplificación exponencial previa en el vector y que puede diferir en los diferentes insectos, aún cuando correspondan al mismo estadio; sobrevivencia de los 14 triatomíneos durante los períodos de incubación (entre 30 y 90 días) y cuya mortalidad, en nuestra experiencia se estima en 15% (2 insectos muertos por XD a los 90 días de incubación en 150 XD estudiados); selectividad de cepas del parásito en el intestino medio del vector (Solari *et al.*, 2001), etc. No obstante estas desventajas, los resultados de qPCR son evidencia irrefutable de la persistencia de *T. cruzi* cuando se evalúa un fármaco tripanosomicida, puesto que al contrario de PCR o qPCR aplicado en ADN de *T. cruzi* sanguíneo que puede corresponder a restos parasitarios circulantes que aun no han sido lisados, aun cuando no existe información al respecto de dicha persistencia en los tejidos del paciente, y nuestro laboratorio se dispone a comparar los resultados de un mismo paciente, tanto de la muestra cuantificada sanguínea y la obtenida de XD.

Por otro lado qPCR-XD corresponde a ADN extraído de las formas tripomastigotas circulantes y viables en la sangre del paciente por la capacidades de amplificación naturales ya mencionadas del vector biológico, además se debe evaluar las cepas presentes tanto en la sangre como en las muestras de XD porque en esta última puede existir el caso que PCR no pesquise el parásito debido a la selectividad de cepas del vector (Solari *et al.*, 2001), pudiendo existir falsos negativos en muestras de XD que debe ser considerada.

La técnica de qPCR-XD requiere obligadamente realizar en forma previa XD de los pacientes en estudio, lo que consume gran cantidad de horas microscópicas para el observador. Estudios complementarios a esta memoria, han evidenciado que es posible evitar la fase microscópica convencional del XD y aplicar directamente PCR-XD convencional y qPCR-XD, con mayor sensibilidad en comparación con XD. Otra ventaja importante es que disminuye al mínimo el riesgo de infección accidental por *T. cruzi*.

Otro elemento original de esta tesis, fue confirmar la utilidad del ADN humano como control interno exógeno (CIE) de la reacción de qPCR en deyecciones de *T. infestans* utilizados en el XD humano (Bravo *et al.*, 2012). Experimentos diseñados y realizados durante el trabajo experimental, permitieron evidenciar que a los 30 días de incubación de los triatomos, no quedan evidencias de ADN humano, por lo tanto, el ADN humano constituye un excelente control de inhibición y especificidad de la reacción, el cual, al ser incorporado de manera exógena, es detectado a través de primers diseñados para el cromosoma 12 (X12), cualitativa y cuantitativamente (Bravo *et al.*, 2012). Este CIE está siendo aplicado en nuestro laboratorio además, en reacciones de qPCR aplicadas en ADN extraído de sangre venosa obtenida de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

En relación a los niveles de cuantificación de *T. cruzi* obtenidos mediante qPCR-XD, un 64% tiene valores inferiores a 1 célula parasitaria, pero es necesario destacar que todos estos casos tuvieron XD convencional negativo, y sugieren que el nivel de parasitemia circulante en el individuo, está bajo los niveles detectables por este método. Respecto de esta observación, sería de interés cuantificar *T. cruzi* circulante mediante qPCR en la sangre periférica del individuo en estudio para compararlo con los resultados de qPCR-XD.

Esta memoria fue desarrollada con el propósito de contribuir con nuevas herramientas para la evaluación de eficacia del tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica. En relación a los métodos parasitológicos, se describe en literatura la aplicación de técnicas tales como hemocultivo, XD, PCR (Brito, 2009), PCR-XD (Zulantay *et al.*, 2011) y genotipificación de lineajes de *T. cruzi* (Venegas *et al.*, 2009) en condiciones de pre y/o post-terapia. Este trabajo aborda por primera vez, la aplicación de qPCR-XD que eventualmente podría ser aplicado en estudios de evaluación de eficacia quimioterapéutica. La enorme ventaja de este método, es la demostración de parásitos viables que proceden de la sangre periférica del individuo en estudio y esta observación, desde el punto de vista diagnóstico, es fundamental para el equipo multidisciplinario tratante. Es decir, la cuantificación de *T. cruzi* en sangre permite estimar la carga parasitaria circulante, pero por las desventajas antes mencionadas de este tipo de muestra biológica, especialmente cuando los resultados de qPCR son menores a 1 parásito/ml, el valor de qPCR-XD se potencia, puesto que evidencia *T. cruzi* viable.

Por tanto, qPCR-XD en ensayos posteriores en nuestro laboratorio será aplicado en la evaluación de pacientes que han recibido tratamiento antichagásico.

CONCLUSIONES

Las tres técnicas (XD, PCR-XD y qPCR-XD), permitieron detectar la presencia de *T. cruzi* en las muestras obtenidas de pacientes con Chagas crónico, con un aumento de la positividad de las muestras de XD a medida que aumenta el tiempo post alimentación sobre el paciente.

El análisis estadístico de los resultados permitió confirmar que qPCR-XD presenta ventajas comparativas con XD y PCR-XD, en cuanto a precocidad, positividad y la opción de cuantificar la carga de *T. cruzi* en el vector biológico alimentado sobre individuos con enfermedad de Chagas crónica.

El control interno endógeno (CIE) confirmó su utilidad para verificar los procesos de extracción de ADN en muestras de XD y especificidad de la reacción de qPCR-XD.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico FONDECYT. Financiamiento principal: Proyecto Fondecyt 1100768 (Inés Zulantay) y Financiamiento parcial: Proyecto Fondecyt 1120382 (Werner Apt).

BIBLIOGRAFÍA



1. **APT W**, 1999. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día*. 23: 3-4.
2. **APT W, ARRIBADA A, ZULANTAY I et al.** 2005. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Ann Trop Med Parasitol*. 99:733-741.
3. **APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infect* 25(3): 190-193.
4. **BARBOSA PR.** 2006. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol*. 112:132-133.
5. **BRAVO, N.; MUÑOZ, C.; NAZAL, N.; SAAVEDRA, M.; MARTINEZ, G.; ARAYA, E.; APT, W.; ZULANTAY, I.** 2012. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control. *Parasites & Vectors*. 5:59.
6. **BRITTO, C.** 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 104 Suppl 1: 122-35.
7. **BURGOS, J., ALTCHER, J., PETRUCCELLI, N., BISIO, M., LEVIN, M, FREILIJ, H., SCHIJMAN, AG.** 2009. Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65: 58-61.
8. **DUFFY T, BISIO M, ALTCHER J, BURGOS JM, DIEZ M., SCHIJMAN A.** 2009. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (4): e419.
9. **FERRER, E.; DA CONCEICAO, F.; CAMPIOLI, P.; LARES, M.; LÓPEZ M.; RIVERA M.G.; VIETTRI, M.; MEDINA, M.; SALCEDO, M.; MOROCOIMA, A.; HERRERA, L.** 2008. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas. [En línea] < http://salus-online.fcs.uc.edu.ve/pcr_diag_mol_chagas.pdf >. [Consulta 25-11-2012]

10. **KOOY, R.F.; F. ASHALL, VAN DER PLOEG, M.; PROSPER OVERDULVE, J.** 1989. *On the DNA content of Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 36(1): 73-76.
11. **MONCAYO A.** 2003. Chagas disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 92(1): 577-591.
12. **PIRON, 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 (3):195-200.
13. **RASSI, A., LUQUETTI, AO.** 2005. Critérios de cura da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na espécie humana. In JR Coura (ed.), *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 677-683.
14. **RASSI, A JR., RASSI, A., MARCONES, J.** 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease), *Infect Dis Clin N Am* 26: 275–291.
15. **RODRIGUES J., BORGES-PEREIRA J.** 2011. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 106(6): 641-645.
16. **SCHENONE H.** 1999. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94:289-294.
17. **SCHIJMAN, A.G., BISIO, M., ORELLANA, L., SUED, M., DUFFY, T., MEJIA, A.M., CURA, C., AUTER, F., VERON, V., QVARNSTROM, Y., DEVORGGRAEVE, S., HIJAR, G., ZULANTAY, I., LUCER, R.H., VELAZQUEZ, E., TELLEZ, T., SANCHEZ, Z., GALVÃO, L., NOLDER, D., MONJE. M., LEVI, J.E., RAMIREZ, J.D., ZORRILLA, P., FLORES, M., JERCIC, M.I., CRISANTE, G., AÑEZ, N., DE CASTRO, A.M., GONZALEZ, C.I., ACOSTA, K., YACHELINI, P., TORRICO, F., ROBELLO, C., DIOSQUE, P., TRIANA, O., AZNAR, C., RUSSOMANDO, G., BÜSCHER, P., ASSAL, A., GUHL, F., SOSA, S., DASILVA, A., BRITTO, C., LUQUETTI, A., LADZINS, J.** 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.

18. **SOLARI, A., CAMPILLAY R., ORTÍZ S., WALLACE A.** 2001. Identification of *Trypanosoma cruzi* Genotypes Circulating in Chilean Chagasic Patients. *Experimental Parasitology* 97, 226–233
19. **VENEGAS J., COÑOEPAN W., PICHUANES, S., MIRANDA, S., APT W., ARRIBADA, A., ZULANTAY, I., CORONADO, X., RODRÍGUEZ, J., REYES, E., SOLARI, A., SÁNCHEZ, G.** 2009. Differential distribution of *Trypanosoma cruzi* clones in human chronic chagasic cardiopathic and non-cardiopathic individuals. *Acta Tropica* 109(3):187-93.
20. **ZULANTAY I, APT W, RODRÍGUEZ J, VENEGAS J, SÁNCHEZ G.** 1998. Serologic evaluation of treatment of chronic Chagas disease with allopurinol and itraconazole. *Rev Med Chil.* 126 (3):265-70.
21. **ZULANTAY I, APT W, GIL LC, ROCHA C, MUNDACA K, SOLARI A, SÁNCHEZ G, RODRÍGUEZ C, MARTÍNEZ G, DE PABLOS LM, SANDOVAL L, RODRÍGUEZ J, VILCHEZ S, OSUNA A.** 2007. The PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* in the faeces of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic American trypanosomiasis gives higher sensitivity and a quicker result than routine xenodiagnosis. *Ann Trop Med Parasitol* 101(8):673-9.
22. **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 chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J Antimicrob Chemother* 66:2224–2226.

ANEXOS

Anexo 1. Consentimiento informado proyecto Fondecyt 1100768.



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

Anexo 2

CONSENTIMIENTO INFORMADO
GRUPO DE ESTUDIO

PARASITEMIA CUANTITATIVA Y GENOTIPIFICACION CLONAL
DE CEPAS DE *Trypanosoma cruzi* COMO ESTRATEGIAS
DE EVALUACION DE EFICACIA EN EL TRATAMIENTO
DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA

Nombre del Investigador Responsable: **DRA. INES ZULANTAY**
Institución: **UNIVERSIDAD DE CHILE**
Teléfonos: **9786753**

Nombre del Médico Responsable del Tratamiento: **DR. WERNER APT**
Institución: **UNIVERSIDAD DE CHILE**
Teléfonos: **9786122**

Estimado paciente.....

En la pesquisa de la infección chagásica en adultos procedentes de diversas localidades la IV Región efectuada por nosotros en los últimos años, hemos confirmado, a través de los exámenes de sangre, que usted tiene la enfermedad de Chagas, resultado que ya le hemos entregado a usted en un informe escrito.

Por este motivo, siempre y cuando usted acepte y cumpla con los requisitos señalados a continuación, la invitamos a participar en un estudio para recibir tratamiento con Nifurtimox, medicamento aceptado universalmente para este fin y que está disponible en su región a través del Servicio de Salud Coquimbo. Le explicaremos también los riesgos y los beneficios que tiene recibir este fármaco.

El objetivo de este estudio es tratar a adultos menores de 50 años con enfermedad de Chagas crónica procedentes de la Provincia de Choapa, que no tengan antecedentes de alcoholismo, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia hepática o renal importante y que en caso de ser mujeres, no estén embarazadas.

1



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



07 AGO. 2009

Si Ud. acepta participar será sometido (a) a los siguientes **procedimientos**:

Por única vez antes del tratamiento

1. Se le extraerán 10 cc de sangre periférica para realizar: estudio serológico, parasitológico, pruebas hepáticas y hemograma.
2. Se le aplicará xenodiagnóstico, el cual consiste en aplicar en su antebrazo dos cajitas con vinchucas libres de infección durante 15 minutos.
3. Se le efectuará un electrocardiograma.
4. Se aplicará una encuesta.
5. Será atendida por médico parasitólogo.

De acuerdo a los resultados de los exámenes de laboratorio y a las condiciones físicas observadas en su evaluación médica, usted:

1. Será tratado con Nifurtimox (8-10 mg/Kg/día por 60 días), según protocolo aprobado por Comité de Ética, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
2. La dosis diaria, será repartida en 2 tomas junto con los alimentos.
3. El fármaco se administrará, en lo posible, mediante Terapia Directamente Observada (en cada hospital y/o posta rural, un paramédico o un familiar responsable, supervisará la ingesta del medicamento).

Durante el tratamiento y al terminar el tratamiento:

1. Será citado por el médico encargado del tratamiento en el hospital correspondiente para realizar:
 - evaluación clínica
 - estudio de tolerancia
 - examen de pruebas hepáticas y hemograma mediante la extracción de 5 cc de sangre periférica, que no representa riesgo alguno para su salud.

Después del tratamiento, se le efectuarán 6 controles:

A los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses, y en cada uno de ellos:

1. Se le extraerán 10 cc de sangre periférica para realizar: estudio serológico y parasitológico.
2. Se le aplicará xenodiagnóstico.
3. Se le tomará un electrocardiograma
4. Se aplicará una encuesta clínica, realizada por médico especialista.



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



07 AGO. 2009

Riesgos que puede tener la administración de Nifurtimox: Puede producir ocasionalmente algunos de los siguientes efectos indeseados: náuseas, rash cutáneo (urticaria, eczema), baja de peso, malestar abdominal. En casos excepcionales, puede producir alteraciones hematológicas o de la función hepática y alteraciones neurológicas. Cualquier otro efecto o síntoma, usted deberá comunicarlo al médico tratante de su hospital o consultorio de origen o al Dr. Werner Apt en el teléfono 9786122 (Facultad de Medicina-Universidad de Chile, Santiago).

Costos del tratamiento: El Nifurtimox, fármaco con el que usted será tratado, será financiado por el Servicio de Salud Coquimbo, sin costo alguno para Ud. Todos los exámenes anteriormente mencionados tampoco tienen costo para usted.

Beneficios que puede tener la administración de Nifurtimox: Su participación en este trabajo le permitirá curar o mejorar de su afección, además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes chagásicos crónicos. Es importante señalar que en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, en que usted se encuentra, el porcentaje de curación es de alrededor de un tercio.

Compensación por participar en este estudio: Ud. no recibirá ninguna compensación económica por su participación en el estudio.

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

Información adicional entregada a usted o a su médico tratante: ambos serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en este estudio.

Voluntariedad: Su participación en esta investigación es totalmente voluntaria y se puede retirar en cualquier momento comunicándolo al investigador y a su médico tratante, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habitual de su enfermedad. De igual manera su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro del estudio si consideran que esa decisión va en su beneficio.



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



07 AGO. 2009

Complicaciones directamente relacionadas con la administración de

Nifurtimox: En el caso de que usted presente complicaciones derivadas del tratamiento con Nifurtimox, recibirá el tratamiento médico completo de dicha complicación, financiado por su centro de salud, y sin costo alguno para Ud. o su sistema previsional. Esto no incluye las complicaciones propias de su enfermedad y de su curso natural.

Derechos del participante: Si Ud. requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llamar a:

Investigador Responsable de la Administración del Medicamento
DR. WERNER APT
 Teléfonos: 56-2-9786122

Conclusión:

Después de haber recibido y comprendido la información de este documento y de haber podido aclarar todas mis dudas, otorgo mi consentimiento para que se realicen los procedimientos previos a la terapia, y si cumplo con los requisitos, recibir tratamiento con Nifurtimox y presentarme a los controles posteriores descritos en este documento.

_____	_____	_____
Nombre de la participante	Firma	Fecha

_____	_____	_____
Nombre de informante	Firma	Fecha

<u>DRA. INES ZULANTAY</u>	_____	_____
Nombre del investigador	Firma	Fecha

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

Si se trata de una paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.

Anexo 2. Acta de aprobación proyecto de investigación en seres humanos Fondecyt 1100768.



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

1/2



07 AGO. 2009

**ACTA DE APROBACIÓN
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS**

Con fecha 03 de agosto de 2009, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Sra. Marianne Gaudlitz H., Enfermera, Mg. Humanidades, Vicepresidente
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dr. Leandro Biagini A., Médico Internista
Dra. Lucía Cifuentes, Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz, Sociólogo, Mg. Bioética
Dr. Miguel O’Ryan, Médico Pediatra Infectólogo
Dr. Julio Pallavicini, Médico Psiquiatra

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **“Parasitemia cuantitativa y genotipificación clonal de cepas de Trypanosoma cruzi como estrategias de evaluación de eficacia en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica (Quantitative parasitemia and clonal genotyping of Trypanosoma cruzi strains as evaluation strategies of the efficacy evaluation in the treatment of chronic Chagas disease)”** y cuyo investigador responsable es la **Dra. Inés Zulantay**, quien desempeña funciones en el **Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico, Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.**

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- *Proyecto de investigación in extenso*
- *Consentimiento informado*
- *CV del investigador responsable y de los Co-investigadores*
- *Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.*

El proyecto y los documentos señalados en el párrafo precedente han sido analizados a la luz de los postulados de la Declaración de Helsinki, de las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos CIOMS 2002, y de las Guías de Buena Práctica Clínica de ICH 1996.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl



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

2/2



Sobre la base de esta información el Comité de Ética de la Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile se ha pronunciado de la siguiente manera sobre los aspectos del proyecto que a continuación se señalan:

- a) Carácter de la población estudiada: Investigación terapéutica. 200 enfermos con Enfermedad de Chagas diagnosticada y no tratada.
- b) Utilidad del Proyecto: Proyecto de utilidad, estudiará cuantificación de la parasitosis pre y post tratamiento y sensibilidad del *Trypanosoma cruzi* al nifurtimox.
- c) Riesgos y Beneficios: Beneficios para los enrolados. Los investigadores señalan que todo sujeto participante recibirá tratamiento. Riesgos: molestias propias del tratamiento.
- d) Protección de los participantes: Asegurada en el Consentimiento Informado en su versión original del 18 de junio de 2009.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: si ocurriesen, serán tratadas en el Servicio Público de Salud Coquimbo.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto.

Por lo tanto, el comité estima que el estudio propuesto está bien justificado y que no significa para los sujetos involucrados riesgos físicos, psíquicos o sociales mayores que mínimos.

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión original del 18 de junio de 2009, que se adjunta firmado, fechado y timbrado por el CEISH.

En virtud de las consideraciones anteriores el Comité otorga la aprobación ética para la realización del estudio propuesto, dentro de las especificaciones del protocolo.



Sra. Marianne Gaudlitz/H.
Vicepresidenta
Comité de Ética en Investigación
en Seres Humanos

MGH/mva.
c.c.: Proy. 046-2009
Santiago, 06 de agosto de 2009.

Teléfono: 9786923 Fax: 9786189 Email: ceiha@med.uchile.cl

Anexo 3. Resultados de la observación microscópica de las 150 muestras de deyecciones obtenidas mediante XD en los 3 períodos de estudio.

XENODIAGNÓSTICOS			
N°	30 días	60 días	90 días
1	(-)	(-)	(+)
2	(-)	(+)	(+)
3	(-)	(-)	(+)
4	(-)	(-)	(-)
5	(-)	(-)	(-)
6	(-)	(-)	(-)
7	(-)	(-)	(-)
8	(-)	(++)	(++)
9	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(-)
13	(-)	(-)	(-)
14	(-)	(-)	(-)
15	(-)	(-)	(-)
16	(-)	(+++)	(+++)
17	(-)	(-)	(-)
18	(-)	(-)	(-)
19	(-)	(-)	(-)
20	(-)	(-)	(-)
21	(-)	(-)	(-)
22	(-)	(-)	(-)
23	(-)	(-)	(-)
24	(-)	(-)	(++)
25	(-)	(-)	(-)
26	(-)	(-)	(-)

27	(-)	(-)	(-)
28	(-)	(-)	(-)
29	(-)	(-)	(-)
30	(-)	(++)	(++)
31	(+)	(++)	(++)
32	(-)	(-)	(-)
33	(-)	(-)	(-)
34	(-)	(-)	(-)
35	(-)	(-)	(-)
36	(-)	(-)	(-)
37	(-)	(-)	(+)
38	(-)	(-)	(-)
39	(-)	(-)	(-)
40	(++)	(++)	(++)
41	(++)	(++)	(+)
42	(-)	(-)	(-)
43	(-)	(-)	(+++)
44	(-)	(-)	(-)
45	(-)	(-)	(-)
46	(-)	(-)	(-)
47	(-)	(-)	(-)
48	(-)	(-)	(-)
49	(-)	(-)	(-)
50	(-)	(-)	(-)
POSITIVIDAD			
%	6	14	24

Anexo 4. Resultados de PCR-XD de las 150 muestras de deyección obtenidas mediante XD y posteriormente purificadas.

PCR-XD			
N°	30 días	60 días	90 días
1	(+)	(+)	(+)
2	(+)	(+)	(+)
3	(-)	(-)	(+)
4	(+)	(+)	(+)
5	(+)	(+)	(+)
6	(+)	(+)	(+)
7	(+)	(+)	(+)
8	(+)	(+)	(+)
9	(-)	(-)	(+)
10	(-)	(-)	(-)
11	(-)	(-)	(-)
12	(-)	(-)	(+)
13	(-)	(-)	(-)
14	(+)	(+)	(+)
15	(+)	(+)	(+)
16	(+)	(+)	(+)
17	(+)	(+)	(+)
18	(+)	(+)	(+)
19	(+)	(+)	(+)
20	(+)	(+)	(+)
21	(+)	(+)	(-)
22	(+)	(+)	(+)
23	(+)	(+)	(+)
24	(+)	(+)	(+)
25	(+)	(+)	(+)
26	(+)	(+)	(+)

27	(-)	(+)	(-)
28	(-)	(-)	(-)
29	(+)	(+)	(+)
30	(+)	(+)	(+)
31	(+)	(+)	(+)
32	(+)	(+)	(+)
33	(+)	(+)	(-)
34	(+)	(+)	(+)
35	(+)	(+)	(+)
36	(+)	(+)	(-)
37	(-)	(+)	(+)
38	(-)	(-)	(+)
39	(+)	(+)	(+)
40	(+)	(+)	(+)
41	(+)	(+)	(+)
42	(-)	(-)	(+)
43	(-)	(-)	(+)
44	(+)	(+)	(-)
45	(-)	(-)	(-)
46	(+)	(+)	(-)
47	(+)	(+)	(-)
48	(-)	(-)	(+)
49	(-)	(-)	(+)
50	(-)	(+)	(+)
POSITIVIDAD			
%	68	74	76

Anexo 5. Resultados de la cuantificación de ADN total en 50 muestras de deyección obtenidas mediante XD.

Nº	ADN ng/μl	Nº	ADN ng/μl
1	0,60	26	0,90
2	0,72	27	0,78
3	0,84	28	0,9
4	0,72	29	0,78
5	0,72	30	0,78
6	0,72	31	0,90
7	0,60	32	1,08
8	0,54	33	0,66
9	0,06	34	0,90
10	0,06	35	0,78
11	0,36	36	0,84
12	0,18	37	0,90
13	0,24	38	0,84
14	1,56	39	0,60
15	1,38	40	0,48
16	1,50	41	0,42
17	1,38	42	0,48
18	1,38	43	0,36
19	1,02	44	0,12
20	0,78	45	0,24
21	0,96	46	0,36
22	0,96	47	0,78
23	0,60	48	0,30
24	0,90	49	0,18
25	0,78	50	0,12

Anexo 6. Resultados de la cuantificación de *T. cruzi* en 50 muestras de deyección obtenidas mediante XD a los 90 días, expresado en porcentajes.

RANGOS Parásitos XD 90 días	%
No Ct	2%
<0,1 No cuantificable	18%
>0,1 a 1	46%
>1 a 10	12%
>10 a 100	10%
>100 a 1.000	12%