

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS



EVALUACIÓN DE LA CARGA DE *Trypanosoma cruzi*
EN SANGRE PERIFÉRICA Y XENODIAGNÓSTICO APLICADO
EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA
CARDIÓPATAS Y NO CARDIÓPATAS

JUAN PAUL CASTILLO PACA

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS

Directores
Dra. Inés Zulantay A.
Dr. Werner Apt B.

Santiago, Diciembre 2016

INDICE

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	5
III. MARCO TEÓRICO	7
1. Epidemiología y distribución geográfica.....	7
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> , ciclo de vida y mecanismos de transmisión.....	8
3. Aspectos clínicos.....	9
3.1 Manifestaciones clínicas.....	9
3.2 Cardiopatía chagásica crónica	10
4. Diagnóstico de laboratorio.....	12
4.1. Diagnóstico serológico.....	12
4.2. Xenodiagnóstico.....	12
4.3. Diagnóstico molecular mediante Reacción de la Polimerasa en Cadena.....	13
IV. HIPÓTESIS	13
V. OBJETIVOS	14
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	14
1. Tipo de estudio y población.....	14
2. Manejo de las muestras.....	15
2.1. Xenodiagnóstico.....	15
2.2. Extracción y purificación de ADN.....	15
3. Curva estándar y sistema de detección TaqMan®.....	16
4. Determinación de cardiopatía.....	17
5. Análisis estadístico.....	17
VII. ASPECTOS ÉTICOS	17
VIII. RESULTADOS	18
IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	24
X. BIBLIOGRAFIA	29
XI. ANEXOS	41

I. RESUMEN

En la actualidad, la enfermedad de Chagas (ECh), es considerada una de las “enfermedades desatendidas” más importantes del mundo y debido a sus implicancias médicas, sociales y económicas constituye uno de los principales problemas de salud pública de Latinoamérica. Se estima que 28 millones de personas de la región están expuestos a la infección y que la ECh es causa de muerte a 14.000 personas cada año, mucho más que otras parasitosis en la región, incluida malaria. La ECh causa discapacidad prematura, con un costo anual de 667.000 años de vida ajustados por discapacidad. Desde el punto de vista diagnóstico, la detección del parásito ha mejorado en forma considerable desde la aplicación de la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR). No obstante, la modalidad convencional (PCR Tiempo final), sólo permite detectar la presencia de ADN de *Trypanosoma cruzi* circulante, mientras que la aplicación de PCR Tiempo Real (qPCR), modalidad cuantitativa de PCR, permite obtener información sobre la carga parasitaria de *T. cruzi* circulante. El objetivo de esta tesis fue cuantificar la carga de *T. cruzi* mediante qPCR en sangre (qPCR-S) y deyecciones de triatomíneos alimentados mediante XD (qPCR-XD) en 90 personas con ECh crónica, clasificados según presencia o ausencia de cardiopatía. Todos proceden de áreas endémicas de Chile y participaron en el estudio bajo Consentimiento Informado. La curva estándar de qPCR se elaboró a partir de una concentración conocida de ADN de *T. cruzi*, realizando diluciones seriadas (1/10) en sangre de paciente sin ECh con un rango dinámico entre 10^6 a 10^{-1} parásitos equivalentes/ml (par.eq/ml.) Todos los cálculos se estimaron considerando que cada célula de *T. cruzi* posee 200 fg de material genético. Se aplicó el sistema de detección TaqMan®, en un termociclador Mx3000P™ Stratagene (Agilent Technologies, USA) con los primers satelitales cruzi 1 y cruzi 2. En los grupos de cardiopatas con XD (+) o XD (-) fue posible establecer mediante qPCR-S, que el 57.1% y el 39.5%, respectivamente, presenta cargas parasitarias entre 0.1-1 par. eq./ml. Al aplicar qPCR-XD en los mismos grupos, se observó que el

57.1% de los casos XD (+) tenía entre 1-10 par. eq./ml y el 34.21% de los casos XD (-) entre 0.01-0.1 par. eq./ml. La positividad de qPCR-S y qPCR-XD en el grupo XD (+) fue del 100%, con rangos de parasitemia diferentes, mientras que en el grupo XD (-), la positividad de qPCR-XD fue del 55.27%. En el grupo de no cardiópatas XD (+), fue posible determinar mediante qPCR-S que el 77.8% de los casos tuvieron una carga parasitaria entre 0.1-1 par. eq./ml, mientras que en los casos XD (-), el 52.8% tuvo cargas entre 0.01-0.1 par. eq./ml. En el 36.1% de los casos de este último grupo, qPCR-S no detectó *T. cruzi*. Al aplicar qPCR-XD en el grupo de no cardiópatas XD (+) se estableció que el 44.4% tuvo cargas parasitarias entre 10-100 par. eq./ml, mientras que en los casos XD (-) el 50% de los casos tenía entre 0.01-0.1 par. eq./ml. La positividad de qPCR-XD en XD (-) fue del 72.2%. La mediana de carga parasitaria de *T. cruzi* determinada mediante qPCR-S para el grupo cardiópata fue de 0.07 par. eq./ml y en el grupo de no cardiópatas de 0.02 par. eq./ml. Por otra parte, la mediana de parasitemia de *T. cruzi* qPCR-XD para el grupo de cardiópatas fue de 0.017 par. eq./ml y en el grupo de no cardiópatas de 0.055 par. eq./ml. La prueba de diferencias de Mann-Whitney para las medianas, no encontró diferencias entre las cargas parasitarias entre cardiópatas y no cardiópatas.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* y constituye un importante problema de salud pública en el área endémica comprendida desde el Sur de los Estados Unidos (35° N), hasta Chile y Argentina (34.5° S en Chile y 45° S en la región patagónica Argentina) (OPS/OMS, 1999; Ferreira *et al*, 2000). Se estima que existen entre 7 y 8 millones de personas infectadas, en tanto que alrededor de 60 millones se encuentran en riesgo de adquirir la infección (OPS, 2006; Coura JR, 2007).

En Chile, se estima que existen aproximadamente 145.000 individuos infectados en la zona endémica, comprendida entre la XV y la VI Región, incluida la Región Metropolitana, siendo más frecuente en áreas rurales y periurbanas de la III y IV Región (Apt *et al*, 2010). En el mismo territorio los vectores biológicos involucrados en la transmisión de *T. cruzi* son insectos de la subfamilia Triatominae: *Triatoma infestans*, de hábitos domésticos, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi*, de hábitos silvestres (Frías *et al*, 1998; Canals *et al*, 2000).

Un total de 180 especies de mamíferos pertenecientes a los Ordenes: Didelphidomorphia, Lagomorpha, Chiroptera, Rodentia, Pilosa, Cingulata, Carnivora, Primata, Perisodactyla, se han encontrado naturalmente infectados por *T. cruzi*, incluyendo al hombre (Herrera 2010).

Después de la fase aguda de la infección, la ECh entra en una fase crónica, inicialmente con una forma asintomática o indeterminada. Posteriormente el 20-30% de los pacientes desarrolla alteraciones cardíacas (forma cardíaca), un 10% alteraciones digestivas (forma digestiva) o ambas (forma mixta) y menos del 5%, la forma neurológica. El resto permanecerá en la forma indeterminada, sin ningún tipo de manifestaciones clínicas durante toda su vida (Días 1995).

La etapa crónica se caracteriza por parasitemia baja y fluctuante (Schenone & Rojas, 1999). En esta fase, las formas tripomastigotas circulantes de *T. cruzi* pueden ser recuperadas por exámenes parasitológicos convencionales tales como xenodiagnóstico (XD) y hemocultivo. No obstante, estos procedimientos tienen bajo rendimiento (Castro *et al*, 2002).

Una técnica de biología molecular que ha demostrado tener alta sensibilidad en la detección de *T. cruzi* es la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual ha sido aplicada en diferentes muestras biológicas (Russomando *et al*, 1996; Britto *et al*, 2001). Es así como se ha reportado la aplicación de PCR en deyecciones de triatomos experimental y naturalmente infectados (Chiurillo *et al*, 2003; Campos *et al*, 2006) y alimentados mediante XD sobre pacientes con ECh (Silber *et al*, 1997, Campos *et al*, 2006, Saavedra *et al*, 2013).

Puesto que el ADN de *T. cruzi* es abundante, se puede extraer fácilmente y ha constituido blanco de PCR en numerosos estudios (Junqueira *et al*, 1996). En contraste, la tecnología de PCR en Tiempo Real (qPCR) utiliza marcadores fluorescentes para la monitorización continua de la amplificación de toda la reacción. Las principales ventajas son el rápido procesamiento de los resultados (amplificación y detección en un solo paso) y la reducción del riesgo de contaminación de las muestras. La técnica de qPCR se puede optimizar tanto como un ensayo cualitativo y cuantitativo (Piron *et al*, 2007), por ello qPCR constituye una alternativa adecuada para determinar la carga parasitaria en pacientes chagásicos (Piron *et al*, 2007; Ortiz *et al*, 2012).

El objetivo de esta tesis fue cuantificar la carga de *T. cruzi* mediante qPCR en sangre periférica y deyecciones de triatomos alimentados mediante XD en individuos con ECh crónica, clasificados según presencia o ausencia de cardiopatía.

III. MARCO TEÓRICO

1.- Epidemiología y distribución geográfica

La ECh o Tripanosomiasis Americana existe desde tiempos remotos en el continente americano. Por ello se ha planteado que el parásito causante de esta enfermedad, circuló primero en mamíferos y vectores silvestres para luego adaptarse al ciclo doméstico de transmisión. Este hecho fue favorecido por el desarrollo de la vida sedentaria de las tribus precolombinas y la construcción de viviendas más duraderas (Apt y Reyes, 1990). La distribución territorial de *T. cruzi* y sus vectores (insectos triatominos, comúnmente llamados “vinchucas”) comprende desde el Sur de los Estados Unidos (35° N), hasta Chile y Argentina (34.5° S en Chile y 45° S en la región patagónica Argentina), donde han sido halladas evidencias de su presencia en comunidades indígenas que poblaron el extremo norte de Chile (Rothhammer *et al*, 1985). Al analizar muestras de tejidos momificados en Atacama se ha logrado recuperar DNA de *T. cruzi*, aplicando la técnica de PCR (Ferreira *et al*, 2000). Además, se diagnosticó en una momia de unos 1000 años de antigüedad patologías asociadas a la ECh (megacolon), infección que posteriormente fue confirmada mediante análisis moleculares (Dittmar *et al*, 2003). Es probable que en la antigüedad la infección haya sido adquirida debido a la ingestión accidental de alimentos contaminados con *T. cruzi*, tal como fue reportado por Pinto (2006) y Rodríguez-Morales (2008) para casos actuales y por Aufderheide *et al* (2005) en el registro arqueológico. Este último grupo de investigadores reportó el hallazgo de restos de *T. cruzi*, en coprolitos de momias de Perú y del norte de Chile (9000 años de antigüedad A.C.).

En Chile, el área endémica de la ECh se distribuye en sectores rurales y periurbanos de las seis primeras regiones político-administrativas, más la Región Metropolitana, y la XV Región de Arica y Parinacota, siendo las regiones III y IV consideradas hiperendémicas (Schenone *et al*, 1995).

2.- *Trypanosoma cruzi*, ciclo de vida y mecanismos de transmisión

El parásito *T. cruzi* fue descrito por primera vez por Carlos Chagas en 1909, en Minas Gerais, Brasil. Como agente etiológico de la ECh, pertenece al Orden Kinetoplastida y es miembro de la Familia Trypanosomatidae. Son protozoos flagelados con 1 o 2 flagelos que contienen una estructura que es el kinetoplasto. El DNA kinetoplastídico (kDNA) representa entre un 10-20% del DNA total del parásito. El genoma de *T. cruzi* es superior al de otros parásitos ($100-200 \times 10^6$ pb) (Brener *et al*, 2000). *T. cruzi* está constituido por una población heterogénea, de estructura básicamente clonal compuesta por un conjunto de linajes o DTUs que circulan en los ciclos doméstico y selvático incluyendo humanos, vectores y reservorios animales (Tibayrenc *et al*, 1986; Tibayrenc 2003).

Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*

El ciclo biológico se inicia cuando el hospedador invertebrado, insecto triatomino, ingiere sangre con formas tripomastigotes de *T. cruzi* desde mamíferos infectados. Al llegar al estómago del insecto, las formas tripomastigotes se transforman en esferomastigotes y epimastigotes. Luego los parásitos migran hacia el intestino, donde se multiplican como formas epimastigotes (Brener *et al*, 2000). Los epimastigotes se unen al epitelio del intestino medio y posterior, y también a la capa cuticular del epitelio de la glándula rectal y del saco rectal (Schaub & Böker 1987). A los 15 a 30 días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del triatomino. Cuando el insecto pica al mamífero, emite deyecciones con formas tripomastigotes metacíclicos y epimastigotes, que ingresan a través de la piel o mucosas del vertebrado (mamífero). En el interior de la célula los tripomastigotes se transforman a la forma amastigote y ahora libres en el citoplasma, después de 35 horas de haber ingresado a la célula, comienza el proceso de fisión binaria y cuando llegan a un número cercano a los 500 amastigotes, sincronizadamente se transforman a tripomastigotes, se produce la ruptura de la célula hospedera liberando estos tripomastigotes que podrían invadir células cercanas o salir al torrente linfático y sanguíneo y así distribuirse por el cuerpo del hospedero vertebrado (Brener *et al*, 2000).

Mecanismos de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

El principal mecanismo de transmisión de *T. cruzi* es vectorial (representa entre un 80-90% de la transmisión), Chile logró la interrupción de la transmisión vectorial de la ECh en los domicilios desde 1999 (OMS, 2000; Lorca *et al*, 2001).

En cuanto a la transmisión sanguínea, este mecanismo es controlado en Chile a través de tamizaje en los Bancos de Sangre según la normativa vigente (Gobierno de Chile. MINSAL 2000). Desde 1985 no se describen casos de transmisión por esta vía.

La transmisión transplacentaria o congénita ha sido reportada entre 2 a 11% de embarazos en mujeres crónicamente infectadas en algunas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay (de Rissio *et al*, 2009; Apt *et al*, 2010).

Excepcionalmente, la ECh se puede adquirir por trasplante de órganos o médula (Rassi *et al*, 2012), infecciones accidentales de laboratorio y a través de la vía oral por ingestión de alimentos y líquidos contaminados con deyecciones de triatomíneos, constituyendo este último mecanismo brotes de transmisión con numerosos casos agudos (Schenone *et al*, 1985; Wendel *et al*, 1992; Rassi *et al*, 2012; Noya *et al*, 2015).

3.- ASPECTOS CLÍNICOS

3.1 Manifestaciones clínicas en humanos

La etapa inicial de la ECh se caracteriza por una elevada parasitemia debido a que las formas tripomastigotes circulantes en sangre diseminan la infección en un incremento exponencial de parásitos intracelulares y sanguíneos (fase aguda). El parasitismo, eventualmente decae por la respuesta inmune del hospedero y gradualmente la parasitemia patente de fase aguda evoluciona a una parasitemia subpatente (Pinto *et al*, 1990; Wendel *et al*, 1992; Brener *et al*, 2000). Superada esta etapa, el hospedero puede permanecer sin sintomatología alguna, es decir, en una fase indeterminada o asintomática. En esta fase crónica hay niveles bajos de parasitemia lo que dificulta el diagnóstico parasitológico. Mientras un 50% de los casos pueden permanecer asintomáticos toda su vida, el otro 20% desarrolla cardiopatías de lenta evolución y llevar a la muerte de los pacientes por

insuficiencia cardíaca, trastornos de la conducción y graves arritmias. Por otra parte un 10% desarrolla visceromegalias a nivel de esófago y colon (Brener *et al*, 2000).

3.2 Cardiopatía chagásica crónica humana

En Chile, la cardiopatía chagásica crónica (CCC) corresponde al 30% de los casos de las personas infectadas, por ello es la principal causa de discapacidad y mortalidad en estos individuos (Apt *et al*, 2015). Inicialmente la CCC puede ser asintomática, pero con evidentes alteraciones electrocardiográficas. Los síntomas más frecuentes que presentan son las palpitaciones y disnea de esfuerzo, siendo la insuficiencia cardíaca la progresión de la cardiopatía. Las arritmias son frecuentes y variadas, todos signos de mal pronóstico. El bloqueo atrio-ventricular (A-V), más el bloqueo completo de la rama derecha, con o sin hemibloqueo anterior izquierdo, son sugerentes de esta patología. En corazones dilatados se presentan fenómenos tromboembólicos que pueden ocasionar infartos pulmonares y cerebrales (Apt *et al*, 2010). Existe fibrosis miocárdica focal o extensa, que originan microaneurismas de la punta del ventrículo izquierdo, lesión que resulta de la destrucción de las células del miocardio debido a la acción directa del parásito, la respuesta inflamatoria y la afección neuronal (Zingales *et al*, 2012).

La cardiomiopatía chagásica es una condición arritmogénica y la muerte súbita puede ser la primera manifestación de la enfermedad (Sternick *et al*, 2006). La ECh puede presentarse con extrasístoles ventriculares, taquicardia ventricular de corta duración (TV) o con taquicardia ventricular maligna (Ribeiro *et al*, 2008), esto probablemente debido a áreas de necrosis y fibrosis por la inflamación del miocardio y también se asocia con lesiones microvasculares o cambios autonómicos que regulan la perfusión sanguínea del miocardio lesionado.

El daño a las uniones intercelulares provoca cambios en el potencial eléctrico y alteran la conducción del estímulo entre las células, provocando el desacoplamiento eléctrico, ralentiza la conducción de estímulos y bloqueo unidireccional, este proceso, asociada con las áreas fibróticas, forma el circuito de reentrada que causa arritmias ventriculares (Ribeiro *et al*, 2008).

El reconocimiento de la fibrosis, ya sea por imagen cardíaca mediante resonancia magnética (RMC) o métodos electrocardiográficos (ECG), permite el reconocimiento de los pacientes propensos a desarrollar complicaciones arrítmicas (Ribeiro *et al*, 2008; Mello *et al*, 2012), utilizando la técnica de realce tardío, puede ser útil para seleccionar pacientes con taquicardia ventricular total o regional, con alto grado de fibrosis y en mayor riesgo de taquicardia ventricular clínica (Mello *et al*, 2012). La presencia de zonas de conducción lenta en el miocardio puede ser reconocido por la existencia de QRS prolongado al ECG, que constituye ser un predictor independiente de mortalidad en pacientes con ECh (Ribeiro *et al*, 2008). Dado que tanto la RMC y el ECG de señal promediada no están fácilmente disponibles, un método simple, no invasivo alternativo es un sistema de puntuación, ECG QRS de 12 derivaciones, que cuantifica la fibrosis miocárdica (Strauss *et al*, 2011). Pacientes con ECh pueden haber reducido la modulación vagal sobre el nodo sinusal, causando disminución de la respuesta de la frecuencia cardíaca al estímulo fisiológico y farmacológico (Villar *et al*, 2004), así como alteración de la variabilidad de la frecuencia cardíaca, medida en el tiempo con métodos no lineales (Guzzetti *et al*, 1991; Ribeiro *et al*, 2011). Estas anomalías ocurren temprano en el curso de la enfermedad, incluso antes del desarrollo de la enfermedad cardíaca manifiesta, generalmente con anomalías leves (Villar *et al*, 2004; Ribeiro *et al*, 2011), lo que sugiere un mecanismo específico de la enfermedad subyacente. La disfunción vagal parece ser más prominente en pacientes con disfunción del ventrículo izquierdo (Raadschilders *et al*, 2014) y se puede detectar incluso en pacientes mayores con ECh, pero menores de 70 años de edad (Ribeiro *et al*, 2011). Aunque se ha demostrado que la disfunción autonómica es un hallazgo temprano y típico en la historia natural de la ECh humana (Ribeiro *et al*, 2001; Junqueira, 2012), la asociación entre la alteración de la modulación autonómica cardíaca y muerte súbita sigue siendo difícil de alcanzar. No obstante la positividad de PCR para *T. cruzi*, se asocia con la presencia y la gravedad de la cardiomiopatía, lo que sugiere un papel directo de la persistencia del parásito en la patogénesis de la enfermedad (Sabino *et al*, 2015).

4.- Diagnóstico parasitológico convencional

El diagnóstico parasitológico de la ECh se basa en demostrar la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en la fase aguda de la infección. Las más utilizadas son: examen microscópico de sangre al fresco, microstrout, gota gruesa y XD (Apt *et al*, 2006; OPS 2006).

4.1 Diagnóstico serológico

En Chile, el diagnóstico serológico de la ECh se realiza en forma rutinaria mediante la técnica de hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Zulantay *et al*, 1998). La sensibilidad de estas técnicas es dependiente de la fase en que se encuentre la enfermedad y del tipo de inmunoglobulina estudiada.

4.2 Xenodiagnóstico (XD)

En Chile, el estudio parasitológico de la infección chagásica humana, se ha efectuado principalmente a través de XD, debido a la carencia de otros métodos más eficaces para detectar *T. cruzi* en la sangre de individuos infectados (Schenone *et al*, 1995). Este método presenta una mayor sensibilidad en individuos jóvenes y con infección reciente. De esta manera, se han reportado sensibilidades en grupos etáreos menores de 10 años del 60,8% y 75%. En la infección crónica, en cambio, se ha reportado una sensibilidad de 49,3%. Sin embargo, su rendimiento aumenta significativamente a medida que aumenta el número de cajas utilizadas (Schenone, 1999).

4.3 Diagnóstico molecular mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Desde hace algunos años, la técnica de PCR ha sido aplicada como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la ECh, permitiendo no solamente detectar la presencia de *T. cruzi* en la sangre, sino también caracterizar genéticamente los linajes circulantes (Noireau, 1999). La técnica de PCR ha permitido optimizar el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* amplificando ADN

desde regiones altamente repetidas de su genoma, constituyéndose en una promisorio herramienta para ser utilizada en el diagnóstico y evaluación terapéutica de la infección (Zulantay *et al*, 2004; Apt *et al*, 2013). El PCR convencional es una reacción exponencial, por lo que pequeñas oscilaciones en la eficiencia de la amplificación en cada muestra originan variaciones importantes en la cantidad del ADN obtenido al final del proceso. Por el contrario, en la reacción de PCR cuantitativa o en Tiempo Real (qPCR), los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en la misma reacción. Debido a que qPCR es un método preciso para cuantificar ADN de *T. cruzi*, se puede utilizar para el seguimiento de la parasitemia (Moreira *et al*, 2013).

La ECh, es una enfermedad de gran impacto en la salud pública a nivel mundial, de ahí que reviste importancia, determinar si existe diferencia en la parasitemia circulante en sangre de individuos con ECh crónica cardiopatas y no cardiopatas determinada en muestras de sangre periférica y en el triatomino utilizado en el XD, ésta última considerada técnica estándar y evidencia irrefutable de la presencia del parásito en los pacientes estudiados.

IV. HIPÓTESIS

Es importante conocer cuáles son los individuos infectados con *T. cruzi* que desarrollarán daño cardíaco y cuáles no. Hasta la fecha, no hay marcadores que respondan a esta pregunta (Venegas *et al*, 2010; Requena-Méndez y López, 2013; Urbina 2015). Para determinar si la carga parasitaria está relacionada a la presencia de cardiopatía en individuos con ECh crónica, se formula la siguiente hipótesis:

"La carga parasitaria en sangre periférica de individuos con ECh crónica y deyecciones de triatomino alimentados mediante XD en individuos cardiopatas, es mayor que la observada en individuos no cardiopatas".

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la carga de *Trypanosoma cruzi* en sangre de individuos y deyecciones de triatomíneos alimentados mediante XD en individuos con enfermedad de Chagas crónica, según presencia o ausencia de cardiopatía.

Objetivos Específicos

- Evaluar la carga parasitaria en la sangre de individuos con enfermedad de Chagas crónica, según presencia o ausencia de cardiopatía.

-Evaluar la carga parasitaria en deyecciones de triatomíneos alimentados mediante XD en individuos con enfermedad de Chagas crónica, según presencia o ausencia de cardiopatía.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Tipo de estudio y población

Estudio descriptivo, cuasi-experimental. La población en estudio correspondió a 50 individuos cardiopatas y 50 individuos no cardiopatas, todos ellos con ECh crónica y procedentes de zonas urbanas y rurales de las comunas de Illapel, Salamanca y Combarbalá, IV Región de Coquimbo, Chile. La condición de infectado por *T. cruzi* fue establecida mediante la aplicación de las técnicas serológicas convencionales ELISA e IFI IgG para *T. cruzi* (Zulantay *et al*, 2007). La condición de cardiopata fue previamente establecida según los protocolos establecidos en el proyecto de investigación FONDECYT 1120382.

2.- Manejo de las muestras

2.1 Xenodiagnóstico (XD)

El XD fue aplicado según técnica descrita por Schenone (1999), aplicando dos cajas de madera cilíndricas conteniendo cada una siete ninfas de *T. infestans* no infectadas de tercer o cuarto estadio, sometidas a ayuno durante un período de 3-4 semanas. Los insectos fueron alimentados durante 20-30 min en el antebrazo de cada uno de los individuos en estudio. Luego de su alimentación las cajas de XD se incubaron a 27 °C y una humedad relativa del 70% en condiciones de ayuno. Después de 30, 60 y 90 días de incubación, las muestras de deyecciones de los triatomíneos se obtuvieron mediante la compresión abdominal en una campana de bioseguridad. Los sobrenadantes de las muestras individuales conformaron un pool que fue sometido a proceso de extracción y purificación de ADN.

2.2. Extracción y purificación de ADN

2.2.1. Muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron obtenidas de los individuos en estudio a los cuales se extrajo 5 ml de sangre venosa recibida en proporción 1:1 de solución de clorhidrato de Guanidina 6 M, EDTA 0,2 M pH 8,0. La solución se incubó a 98 °C durante 15 min para deconcatenar el ADN de los minicírculos de *T. cruzi* y fue almacenada a 4°C, hasta la extracción de ADN, la cual se realizó en un volumen inicial de 200 µL, utilizando el Kit de ADN QIAamp® Blood Mini (Qiagen, Valencia, CA), según protocolo del fabricante, el ADN extraído se encontraba disponible a -20°C para realizar su amplificación qPCR-Sangre (qPCR-S).

2.2.2. Muestras de deyecciones

Antes de realizar el proceso de extracción de ADN de las deyecciones, se agregó 20 ng de ADN de sangre humana negativa para *T. cruzi* como control interno exógeno. La purificación del ADN se realizó utilizando un volumen inicial de 100 µl con el Kit de extracción de ADN genómico FavorPrep Blood Mini kit (Favorgen, Biotech Corp.), modificado por la omisión de la etapa de lisis de células con

proteínasa K. El eluído se encontró disponible a -20 °C hasta que se llevó a cabo el qPCR-Xenodiagnóstico (qPCR-XD).

3. Curva estándar y sistema de detección TaqMan®

El sistema de detección de TaqMan® se aplicó en el termociclador Stratagene Mx3000P™ (Agilent Technologies) en condiciones sugeridas por el fabricante y utilizando partidores de ADN descritos en Schijman *et al*, 2011. La mezcla de reacción consistió en 2µl de la muestra a ser investigada (DNA extraído de sangre y deyecciones), 10 µl Brilliant Multiplex qPCR (Stratagene), 0,5 µl de una dilución 1:500 de un colorante de referencia (ROX), 0,5 µl de cada uno de los primers nucleares Cruzi 1 y Cruzi 2, 0,2 µl sonda Cruzi 3, 0,2 µl BSA (100x) y 6,1 µl de agua libre de nucleasas (Mo Bio Laboratories Inc.), en un volumen final de 20 µl. Para obtener la curva estándar, se utilizó un stock de formas epimastigotes de *T. cruzi*, cepa *Tulahuén*. La cuantificación de ADN total de esa cepa se llevó a cabo utilizando el kit AccueBlue™ dsDNA Cuantificación (Biotum Inc.) y el termociclador qPCR Mx3000P™ (Stratagene, Agilent Technologies Inc.). La concentración de ADN de *T. cruzi* se ajustó a 1×10^6 parásitos equivalentes/ml, teniendo en cuenta la estimación que 1 parásito contiene 200 fg de ADN (Duffy *et al*, 2009). El ADN se diluyó 1:10. La curva estándar de *T. cruzi* estuvo disponible a -20 °C hasta su uso. Paralelamente, se utilizó como control interno (CI) de qPCR, parte de una secuencia del cromosoma 12 (X12). El CI 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. (Bravo *et al*, 2012)

4.- Determinación de cardiópata

A todos los individuos del estudio se les realizó electrocardiograma de 12 derivaciones, en su centro asistencial de origen. Posteriormente, la condición electrocardiográfica fue evaluada a doble ciego por cardiólogo especialista, de

acuerdo a protocolos recomendados por la Organización Mundial de la Salud (Maguire *et al*, 1982).

5.- Análisis Estadístico

En la descripción de los datos se utilizaron gráficos y tablas. Para el análisis de datos y comparación de promedios entre grupos (cardiópatas y no cardíopatas) se utilizó la prueba de Chi cuadrado y, para realizar la comparación de medianas entre los grupos de cardíopatas y no cardíopatas, se utilizó la prueba de Mann-Whitney en el programa SPSS v.23. Adicionalmente, se utilizaron los programas Word y Excel.

VII. ASPECTOS ÉTICOS

Todas las personas aceptaron bajo consentimiento informado, aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Resolución 046/2011) participar en el estudio.

VIII. RESULTADOS

La totalidad de muestras que fueron evaluadas mostraron amplificación para el CI, lo que indica que no hubo pérdida de material genético durante el proceso de extracción de las muestras de XD e inhibición de la reacción de qPCR, descartándose falsos negativos en las muestras que no amplificaron para *T. cruzi*.

En la Figura 1 se puede observar la curva estándar de *T. cruzi* con los valores de R²(Coeficiente de determinación), Y (Pendiente),y Eff (Eficiencia) y algunas muestras de sangre de los pacientes en estudio intersectadas en la curva. (▲)

Figura 1. Curva estándar de qPCR (■) para *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre periférica de individuos con enfermedad de Chagas crónica. Rango dinámico 10⁶ a 10⁻¹ parásitos equivalentes/ml. Valores de la curva estándar: Rsq = 0.999, Y= -3.359, Eff: 98.5%.

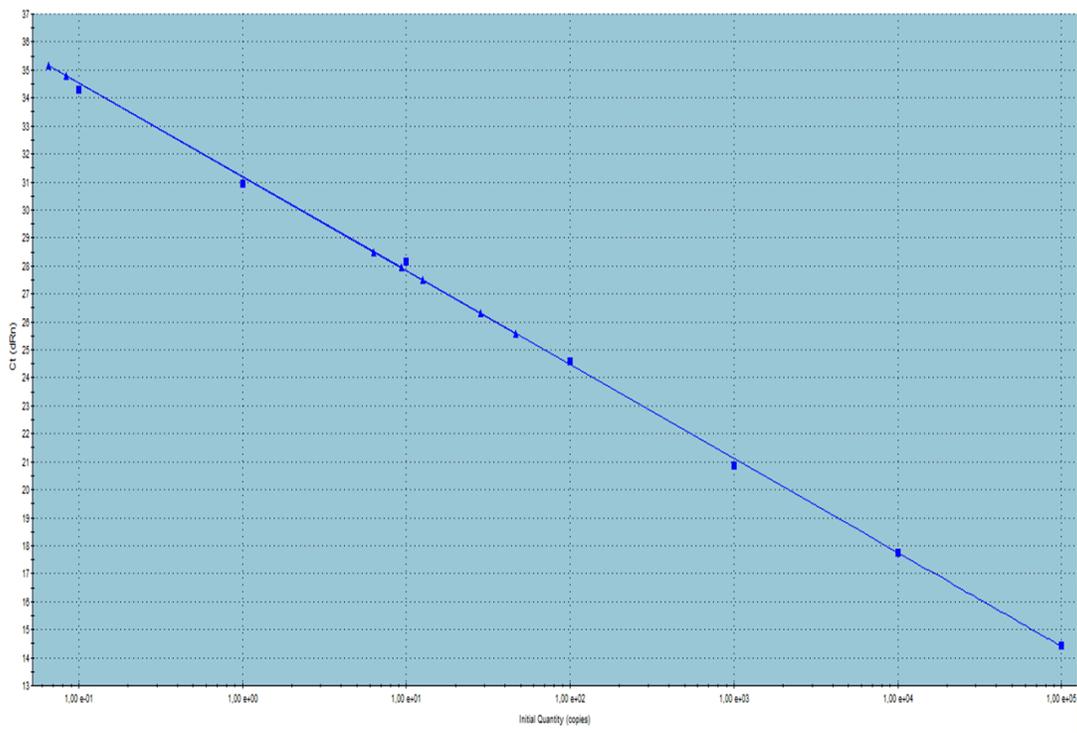


Tabla 1

Resultados de Xenodiagnóstico en individuos cardiópatas y no cardiópatas procedentes de la IV Región de Chile

ECG	XENODIAGNOSTICO				TOTAL	
	Negativo	%	Positivo	%	N	%
No cardiópata	38	84,4	7	15,6	45	100
Cardiópata	36	80,0	9	20,0	45	100
TOTAL	74	82,2	16	17,8	90	100

Se realizó xenodiagnóstico a un total de 90 muestras. En 16/90 casos (17,8%) se observaron tripomastigotes a la microscopía, mientras que 74/90 casos (82,2%) los resultados fueron negativos. En el grupo de no cardiópatas 7/45 (15,6%) fueron XD positivos y 38/45 (84,4%) XD negativo. En el grupo de cardiópatas 9/45 (20%) obtuvo XD positivos y en 36/45 casos (80%) el XD fue negativo (Tabla 1).

No se observó diferencias significativas de la positividad del XD entre individuos con trazado electrocardiográfico normal (no cardiópatas) y electrocardiograma alterado (cardiópatas). Chi cuadrado= 0.72, p-value = 0.396

Tabla 2

Carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* determinada por PCR tiempo real en muestras de *Triatoma infestans* utilizados en Xenodiagnóstico (qPCR-XD) y en sangre periférica (qPCR-S) de 45 individuos chagásicos crónicos cardiópatas, según los resultados de XD.

Rangos de carga parasitaria par. eq/ml	XENODIAGNÓSTICO							
	POSITIVO				NEGATIVO			
	n= 7				n=38			
	qPCR-S		qPCR-XD		qPCR-S		qPCR-XD	
	n	%	n	%	n	%	n	%
No Ct	0	0	0	0	8	21	17	44.73
0.01-0.1	1	14.3	0	0	14	36.9	13	34.21
0.1-1	4	57.1	0	0	15	39.5	6	15.79
1-10	2	28.6	4	57.1	1	2.6	1	2.63
10-100	0	0	2	28.6	0	0	1	2.63
100-1,000	0	0	1	14.3	0	0	0	0

En la Tabla observamos que en la cuantificación de *T. cruzi* por qPCR-S, en 7 casos con XD positivo el 57.1% y el 28.6% tenían carga parasitaria entre 0.1-1 y 1-10 par. eq./ml, respectivamente. Por otro lado, en los casos con XD negativo, qPCR-S en 15 casos (39.5%) evidencio una carga parasitaria entre 0.1-1 par. eq./ml, mientras que 14 casos (36,9%) tenía una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par. eq./ml. Un solo caso tenía carga parasitaria entre 1-10 par. eq./ml. En el grupo XD positivo, la positividad de qPCR-XD y qPCR-S fue del 100%; pero los rangos de parasitemia fueron diferentes.

En relación a la cuantificación de *T. cruzi* por qPCR en deyecciones de casos positivos por XD, qPCR-XD permitió establecer que en el 57.1% (4/7 casos) la carga parasitaria fluctuó entre 1 y 10 par. eq./ml. En este grupo la carga parasitaria más pequeña fue entre 100-1000 par. eq./ml (14.3%). En los casos con XD

negativo qPCR-XD, el 34.21% de ellos (13/38 casos), tuvo una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par. eq./ml. La carga más baja y más alta de parásitos fluctuó entre 0.01-0.1 par. eq./ml (34,21%) y 10-100 par. eq./ml (2.63%). En 8 casos (21,0%) *T. cruzi* no se detectó, la positividad de qPCR-XD en el grupo negativo XD fue del 55.27%. (Tabla 2).

Tabla 3

Carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* determinada por qPCR en muestras de *Triatoma infestans* utilizados en Xenodiagnóstico (qPCR-XD) y de la sangre periférica (qPCR-S) en 45 individuos chagásicos crónicos no cardiopatas

Rangos de carga parasitaria (par. eq/ml)	XENODIAGNÓSTICO							
	POSITIVO				NEGATIVO			
	n= 9				n=36			
	qPCR-S		qPCR-XD		qPCR-S		qPCR-XD	
	n	%	n	%	n	%	n	%
No Ct	0	0	0	0	13	36.1	10	27.8
0.01-0.1	1	11.1	0	0	19	52.8	18	50
0.1-1	7	77.8	2	22.2	3	8.3	3	8.3
1-10	1	11.1	1	11.1	1	2.8	3	8.3
10-100	0	0	4	44.4	0	0	1	2.8
100-1,000	0	0	2	22.2	0	0	1	2.8

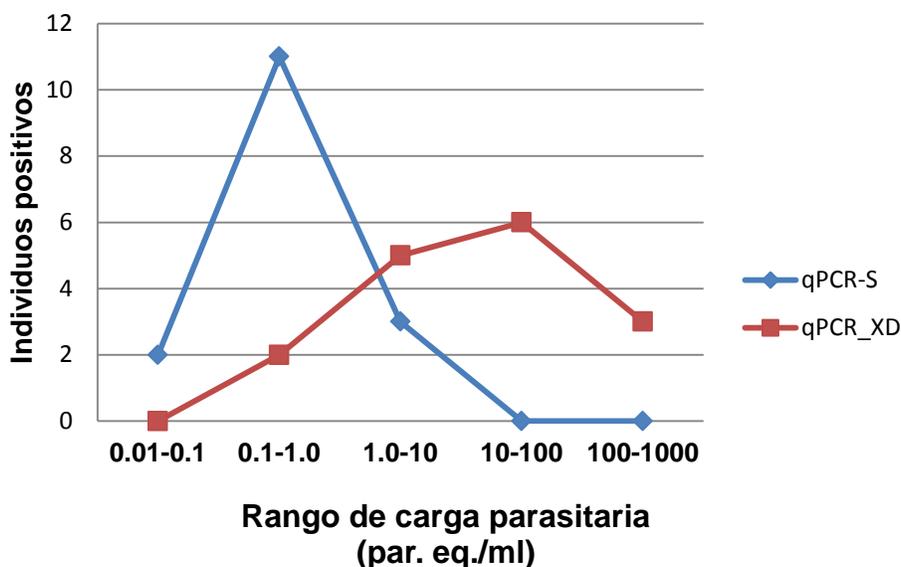
En relación con qPCR-S, en 9 casos con XD positivo, el 77.8% (7 casos) tenía carga parasitaria entre 0.1-1 par. eq./ml y el 11.1% (1 caso) tenía carga parasitaria entre 0.1-1 y 11.1% (1 caso) entre 0.01-0.1 par.eq./ml. Por otro lado, en los casos con XD negativo, qPCR-S, 19 casos (52,8%) tenían una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par. eq./ml, 3 casos (8.3%) tenía una carga parasitaria entre 0.1-1 par. eq./ml y un solo caso tenía carga parasitaria entre 1-10 par. eq./ml(2.8%). En 13 casos (36.1%), *T. cruzi* no se detectó (Tabla 3). En el grupo XD positivo, la

positividad de qPCR-XD y qPCR-S fue del 100%; pero los rangos de parasitemia fueron diferentes.

En la Tabla 3, observamos que la cuantificación de *T. cruzi* por qPCR-XD de casos XD (+) nos permitió establecer que en el 44.4% (4/9 casos) la carga parasitaria fluctuó entre 10 y 100 par. eq./ml. En este grupo la carga parasitaria más pequeña fue entre 1-10 par. eq./ml 11.1%(1/9). En los casos con XD negativo, el 50% de ellos (18/36 casos), tuvo una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par eq./ml. La carga más alta fluctuó entre 100-1000 par.eq./ml (2,8%). La positividad de qPCR-XD en el grupo negativo XD fue del 72.2%.

Gráfico 1

Cuantificación de *Trypanosoma cruzi* en sangre y deyecciones de Xenodiagnóstico (XD) mediante PCR tiempo real en 16 individuos con enfermedad de Chagas crónica cardíopatas y no cardíopatas con XD positivo



En el grafico 1 observamos que en 11 individuos las cargas parasitarias determinadas mediante qPCR-S, se encuentran entre 0.1-1 par.eq./ml, concordante con los niveles de parasitemia en la fase crónica de la ECh. Por otra parte, la determinación mediante qPCR-XD en 11 muestras, evidenciaron cargas parasitarias entre 1-100 par.eq./ml, hecho que confirma la capacidad de amplificación de *T. infestans*.

Tabla 4

Mediana de carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* determinada por qPCR en muestras de *Triatoma infestans* utilizados en Xenodiagnóstico (qPCR-XD) y de la sangre periférica (qPCR-S) en individuos con enfermedad de Chagas crónica cardiopatas y no cardiopatas.

		Cardiópatas n=45	No cardiopatas n=45
qPCR – S (par. eq./ml)	Mediana	0.07	0.02
	Rango	0.0 - 2.4	0.0 - 1.1
<i>Prueba de diferencias de medianas de qPCR-S, no existen diferencias de la parasitemia entre cardiopatas y no cardiopatas (MANN- WHITNEY: P = 0.079)</i>			
qPCR – XD (par. eq./ml)	Mediana	0.017	0.055
	Rango	0.0 - 163	0.0 - 234.1
<i>Prueba de diferencias de medianas de qPCR-XD, no existen diferencias de la carga parasitaria entre cardiopatas y no cardiopatas (MANN- WHITNEY: P = 0.4611)</i>			

IX. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Xenodiagnóstico (XD) es un método parasitológico no rutinario, en el que se utiliza vectores biológicos para amplificar *T. cruzi* (Schenone, 1999; Castro *et al*, 2004; Enríquez *et al*, 2014) y que, a pesar de tener menos sensibilidad que la PCR, es útil en combinación con PCR (Coronado *et al*, 2006; Zulantay *et al*, 2011). Es importante decir que a pesar que XD es una herramienta valiosa para la detección de viabilidad de *T. cruzi*, esta técnica se considera arcaica (Tarleton y Curran, 2012), sin embargo la principal ventaja de XD convencional es su potencial para confirmar la presencia de *T. cruzi* viable y para aislar el parásito (Amato Neto, 2012; Saavedra *et al*, 2013). Es por ello que en la presente tesis se utilizó la capacidad del vector biológico *T. cruzi* para permitir su multiplicación (Kollien y Schaub, 2000). Los resultados son los esperados para individuos con ECh crónica, considerando que Schenone (1999), establece que con 2 cajas de XD, la sensibilidad de detección de *T. cruzi* circulante se estima en 21.7%).

En los seres humanos y diversos mamíferos, la utilidad de la PCR para detectar *T. cruzi* en deyecciones de triatomíneos alimentados por XD ha sido reportado (Campos *et al*, 2007; Pizarro *et al*, 2007; Zulantay *et al*, 2011; Saavedra *et al*, 2013), para mejorar la limitada sensibilidad de la observación directa. Especialmente en deyecciones con un bajo número de parásitos, las técnicas de diagnóstico molecular, tales como PCR convencional, se han aplicado directamente en el ADN extraído de las deyecciones (Breniere *et al*, 1995; Dorn *et al*, 2001; Egaña *et al*, 2014; Oda *et al*, 2014; Santana *et al*, 2014). Por el contrario, la PCR en tiempo real (qPCR), permite la detección y cuantificación de cargas parasitarias de *T. cruzi* (Duffy *et al*, 2009; Cencig *et al*, 2011).

T. cruzi contiene ADN nuclear y ADN kinetoplasto (kADN), ambos contienen muchas secuencias repetitivas y abundantes que son muy adecuadas para la aplicación de PCR (Sturm *et al*, 1989; Avila *et al*, 1993; Requena *et al*, 1996; Elias *et al*, 2003; Duffy *et al*, 2009; Qvarnstrom *et al*, 2012). Por tanto, qPCR es la alternativa preferible para determinar cargas parasitarias por *T. cruzi* (Piron *et al*, 2007; Ortiz *et al*, 2012). Estos métodos de PCR mostraron que la amplificación de

T. cruzi kADN puede complementar XD en la evaluación de la parasitemia en pacientes chagásicos crónicos y también puede ser utilizado como un método complementario junto con pruebas serológicas en los bancos de sangre (Avila *et al*, 1993).

Por esta razón, las muestras biológicas de este estudio (ADN extraídos de deyecciones utilizados en XD), representan una gran ventaja en relación con *T. cruzi* ADN extraído de sangre periférica, porque incluso con muy baja parasitemia, el XD es capaz de amplificar con un inóculo de al menos un parásito vivo (Saavedra *et al*, 2013), lo que constituye una prueba irrefutable de presencia de *T. cruzi* viables. Por lo tanto la positividad de qPCR-XD sugiere la presencia de tripomastigotes viables naturalmente amplificados por el vector biológico. En esta tesis los niveles de *T. cruzi*, en deyecciones de triatominos alimentados por XD en individuos con ECh se cuantificaron por qPCR-XD con el objetivo de evaluar la capacidad de multiplicación de *T. cruzi* en *Triatoma infestans*. Además, qPCR en la sangre periférica (qPCR-S) se llevó a cabo para todos los pacientes en el estudio como se describe (Apt *et al*, 2013) obteniendo resultados interesantes y se pueden interpretar de acuerdo a la capacidad de amplificación que tiene *T. infestans* a partir de células parasitarias circulantes en el individuo sobre el cuál se alimenta. Es así como la parasitemia cuantificada en deyecciones es mayor a la cuantificada en sangre. Dicho comportamiento se observa en cardiópatas (Tabla 2) y no cardiópatas (Tabla 3).

En esta tesis las cargas parasitarias en sangre de individuos con ECh crónica es baja (rangos de 0.0-2.4 en cardiópatas, 0.0-1.1 en no cardiópatas), mientras que en deyecciones de XD es más alta (rango de 0.0-163 cardiópatas, 0.0-234.1 no cardiópatas), lo que se relaciona con las distintas capacidades y múltiples factores relacionados con la vinchuca para amplificar *T. cruzi* (Saavedra *et al*, 2016).

Algunos protocolos de PCR descritos han dado lugar a resultados desiguales, probablemente debido a las diferencias en el volumen de sangre procesada y en el procedimiento de extracción de ADN (Junqueira *et al*, 1996; Virreira *et al*, 2003; Duffy *et al*, 2009; Duffy *et al*, 2013).

Las manifestaciones clínicas y las variaciones en la respuesta inmune observada durante la infección chagásica no se comprenden bien, pero se cree que están asociados con el hospedero o la variabilidad genética del parásito. Varios estudios de infección con *T. cruzi* han confirmado que la diversidad genética se correlaciona con características intrínsecas del parásito como la virulencia, resistencia a los medicamentos, parasitemia, tropismo tisular, alteraciones patológicas, la capacidad para inducir la mortalidad del hospedero y el patrón de respuesta inmune humoral (De Diego *et al*, 1998; Toledo *et al*, 2003; Mejía y Triana *et al*, 2005; dos Santos *et al*, 2009).

Sin embargo, diversos factores deben ser considerados en la sensibilidad de XD: número de cajas utilizadas, la edad del paciente, la capacidad de ingestión por los insectos (Freitas, 1961; Castro *et al*, 1983; Schenone, 1999). El número de parásitos cuantificados por qPCR-XD podría estar relacionado con la eficiencia de la replicación en el insecto y el inóculo inicial durante la alimentación (Apt *et al*, 2013). La fuerte diuresis de triatominos con pérdida de inóculo inicial después de una elevada alimentación sanguínea (Cirano y Zeledón *et al*, 1964, Kollien y Schaub, 2000), la complejidad del metaboloma en heces de triatominos que sugiere que puede afectar a la competencia específica para DTUs del triatomo *T. cruzi* (Antunes *et al*, 2013), la microbiota bacteriana en el intestino triatomo (Gumiel *et al*, 2015), influencia de la inanición en el desarrollo de *T. cruzi* en *Triatoma infestans* (Kollien y Schaub, 1998), la mortalidad durante el período de incubación y la regulación diferencial de las poblaciones de parásitos que muestra que algunas reacciones de defensa de triatominos discriminan no sólo entre las señales moleculares específicas para las infecciones de tripanosoma, sino también entre diferentes cepas de *T. cruzi* (García *et al*, 2010).

Otros aspectos relacionados con el último punto también pueden ser importantes en la sensibilidad de XD: los genotipos de *T. cruzi* amplificados a partir de infecciones simples y mixtas (García *et al*, 2010; Lima *et al*, 2014), la transferencia de un DTU de *T. cruzi* de la mezcla presente en la sangre humana a vector triatomo depende de la especie utilizada en el XD (Santana *et al*, 2014; Ortiz *et al*, 2015), el desarrollo de un genotipo clonal de infección mixta puede ser inhibida

(Pinto *et al*, 1998) y, que las cepas más importantes que pertenece a una de los dos principales DTU, desarrollen diferentes densidades de población en el insecto vector (Schaub, 1989).

Al realizar el XD no se encontró diferencias significativas de la positividad entre cardiópatas y no cardiópatas. Para el grupo de pacientes con ECh cardiópatas XD (+), se determinó mediante qPCR-S, que el 57.1% y el 28.6% tienen cargas parasitarias entre 0.1-1 y 1-10 par. eq./ml, respectivamente. En los casos con XD(-), fue posible determinar mediante qPCR-S que, en 15 casos la carga parasitaria estuvo entre 0.1-1 par. eq./ml, el 36,9% tenía carga parasitaria entre 0,01-0,1 par. eq./ml y, un solo caso (2.6%) tenía carga parasitaria entre 1-10 par. eq./ml. En el grupo de pacientes con XD (+), la positividad de qPCR-XD y qPCR-S fue del 100%; pero los rangos de parasitemia fueron diferentes.

Mientras que la cuantificación de *T. cruzi* por qPCR en deyecciones de casos XD (+), permitió establecer que en el 57.1% la carga parasitaria fluctuó entre 1 y 10 par. eq./ml, y el 14.3% tuvo una carga parasitaria entre 100-1000 par. eq./ml; en los casos XD (-) fue posible determinar mediante qPCR-XD que el 34.21% de ellos, tuvo una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par. eq./ml. La carga más baja y más alta de parásitos fluctuó entre 0.01-0.1 par. eq./ml (34,21%) y 10-100 par. eq./ml (2.63%). En 8 casos (21,0%) *T. cruzi* no se detectó. La positividad de qPCR-XD en el grupo XD (-) fue del 55.27%.

En el grupo de no cardiópatas, fue posible determinar mediante qPCR-S, que de 9 casos XD (+), el 77.8 tenía carga parasitaria entre 0.1-1 par. eq./ml y el 11.1% entre 0.01-0.1, al igual que 11.1% entre 1-10 par.eq./ml. Por otro lado, en los casos con XD (-), qPCR-S permitió determinar que 19 casos tenían una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par. eq./ml, 8.3% entre 0.1-1 par. eq./ml y un solo caso entre 1-10 par. eq./ml (2.8%). En 13 casos (36.1%), *T. cruzi* no se detectó. En el grupo XD (+), la positividad de qPCR-XD y qPCR-S fue del 100%; pero los rangos de parasitemia fueron diferentes. Así mismo observamos que la cuantificación de *T. cruzi* por qPCR-XD de casos XD (+), estableció que el 44.4% la carga parasitaria fluctuó entre 10 y 100 par. eq./ml. En este grupo, la menor carga parasitaria fue entre 1-10 par. eq./ml (11.1%). En los casos XD (-), el 50% de ellos

tuvo una carga parasitaria entre 0.01-0.1 par eq./ml. La carga más alta fluctuó entre 100-1000 par.eq./ml (2,8%). La positividad de qPCR-XD en el grupo negativo XD fue del 72.2%.

La mediana de carga parasitaria de *T. cruzi* determinada por qPCR-S para el grupo cardiópatas fue de 0.07 par.eq./ml con un rango entre 0.0-2.4 par.eq./ml, mientras que en el grupo de no cardiópatas se encontró una mediana de 0.02 par.eq./ml con un rango de 0.0-1.1 par.eq./ml. La prueba de diferencias de Mann-Whitney para medianas no demostró diferencias de la carga parasitaria entre cardiópatas y no cardiópatas. La mediana de parasitemia de *T. cruzi* qPCR-XD para cardiópatas fue de 0.017 par.eq./ml con un rango de 0.0-163 par.eq./ml. E el grupo no cardiópatas, la mediana fue de 0.055 par.eq./ml con un rango de 0.0-1.1 par.eq./ml. La prueba de diferencias de Mann-Whitney para las medianas no encontró diferencias entre cardiópatas y no cardiópatas.

X. BIBLIOGRAFÍA

AMATO NETO V. 2012. *Trypanosoma cruzi*: the supposed removal of the use of the xenodiagnosis and blood culture. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 54:235-36.

ANTUNES LC, HAN J, PAN J, MOREIRA CJ, AZAMBUJA P, BORCHERS CH, *et al.* 2013. Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. PLoS One. 8:e77283.

APT W y REYES H. 1990. Algunos aspectos de la Enfermedad de Chagas en Latinoamérica. Parasitología al Día. 18: 82 - 87.

APT W, HEITMANN I, JERCIC M, JOFRÉ L, MUÑOZ P, NOEMÍ I, SAN MARTÍN A, SAPUNAR J, TORRES M, ZULANTAY I. 2006. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Rev Chil Infect. 25(5):379-383.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERSIC, M.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; NORMANDIN, A.; RIVERA, M.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2010. Guía clínica: "Guía de diagnóstico, tratamiento y prevención de la enfermedad de Chagas". Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. pp. 2-35.

APT W, ZULANTAY I, SOLARI A, ORTIZ S, ODDO D, CORRAL G, *et al.* 2010. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Province of Choapa, IV Region, Chile: Preliminary Report (2005-2008). Biological research. 43(3):269-74.

APT W, ARRIBADA A, ZULANTAY I, RODRÍGUEZ J, SAAVEDRA M, MUÑOZ A. 2013. Treatment of Chagas' disease with itraconazole: electrocardiographic and parasitological conditions after 20 years of follow-up. J Antimicrob Chemother. 68(9):2164–9.

APT W, ARRIBADA A, ZULANTAY I, SAAVEDRA, ARAYA E, SOLARI A, ORTIZ S, ARRIAGADA K, AND RODRÍGUEZ J. 2015. *Trypanosoma cruzi* burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy. Parasitol Res. 114(8): 3007–3018.

AUFDERHEIDE A, W SALO, M MADDEN, J STREITZ, K DITTMAR *et al.* 2005. Aspects of ingestion transmission of Chagas disease identified in mummies and their coprolites. Chungara, Revista de Antropología Chilena. 37: 85-90.

AVILA HA, PEREIRA JB, THIEMANN O, DE PAIVA E, DE GRAVE W, MOREL CM, SIMPSON L. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast

minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. J. Clin. Microbiol. 31:2421–2426.

BRAVO N, MUÑOZ C, NAZAL N, SAAVEDRA M, MARTÍNEZ G, ARAYA E, et al. 2012. Real-Time PCR in faecal samples of *Triatoma infestans* obtained by xenodiagnosis: proposal for an exogenous internal control. Parasites & vectors.;5:59-.

BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª Edição Guanabara Koogan Ed Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp.

BRENIERE SF, BOSSENO MF, TELLERÍA J, CARRASCO R, VARGAS F, YAKSIC N, et al. 1995. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am J Trop Med Hyg. 53(2):179–84.

BRITTO C, SILVEIRA C, CARDOSO MA, MARQUES P, LUQUETTI A, MACÊDO V, FERNANDES O. 2001. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. Mem Inst Oswaldo Cruz 96(6):823-826.

CAMPOS R, BOTTO-MAHAN C, ORTIZ S, ACUÑA M, CATTAN P, SOLARI A. 2006. *Trypanosoma cruzi* detection in blood by xenodiagnosis and polymerase chain reaction in the wild rodent *Octodon degus*. Am J Trop Med Hyg. 76(2):324-36.

CAMPOS R, ACUÑA-RETAMAR M, BOTTO-MAHAN C, ORTIZ S, CATTÁN P, SOLARI A. 2007. Susceptibility of *Mepraia spinolai* and *Triatoma infestans* to different *Trypanosoma cruzi* strains from naturally infected rodent hosts. Acta Trop. 104(1):25–9.

CANALS M, EHRENFELD M, CATTAN P. 2000. Situation of *Mepraia spinolai*, a will vector for Chagas disease in Chile, in relation to others vectors from the perspective of their feeding profile. Rev Med Chile. 128(10):1108-1112.

CASTRO A, LUQUETTI A, RASSI A, RASSI G, CHIARI E, GALVÃO L. 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitology Research 88(10): 894-900.

CASTRO C, SANTOS MC, SILVEIRA CA. 2004. Comparative study between artificial xenodiagnosis performed immediately and four hours after venous punch. Rev Soc Bras Med Trop. 37:128–130.

CASTRO CN, ALVES MT, MACÊDO VO. 1983. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. Rev Soc Bras Med Trop. 16(2):98–103.

CENCIG S, COLTEL N, TRUYENS C, CARLIER Y. 2011. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with Am Bisome. PLoS Negl Trop Dis. 5:e1216.

CHIURILLO M, CRISANTE G, ROJAS A, PERALTA A, DIAS M, GUEVARA P, AÑEZ N, RAMÍREZ JL. 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. Clin Diagn Lab Immunol. 10(5):775-779.

CIRANO R, ZELEDÓN R. 1964. Observaciones sobre capacidad alimenticia y respiración de *Triatoma infestans* y *Rodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) Rev Biol Trop. 12:271–85.

CORONADO X, ZULANTAY I, ALBRECHT H, ROZAS M, APT W, ORTIZ S, RODRIGUEZ J, SANCHEZ G, SOLARI A. 2006. Variation in *Trypanosoma cruzi* clonal composition detected in blood patients and xenodiagnosis triatomines: implications in the molecular epidemiology of Chile. Am. J. Trop. Med. Hyg. 74:1008–1012.

COURA JR. 2007. Chagas disease: what is known and what is needed—a background article. Mem Inst Oswaldo Cruz. 102(1):113-122.

DE DIEGO JA, PALAU MT, GAMALLO C, PENIN P. 1998. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. Trop. Med. Int. Health. 3:222–233.

DE RISSIO AM, SCOLLO K, CARDONI RL. 2009. Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. Medicina. 69(5):529-35.

DIAS J. 1995. Natural history of Chagas' disease. Arq Bras Cardiol. pp 65:359-66

DITTMAR K, AM JANSEN, A ARAÚJO & K REINHARD. 2003. Molecular diagnosis of prehistoric *Trypanosoma cruzi* in the Texas-Coahuila border region. Paleopathology Newsletter: 4. Thirteenth Annual Meeting of the Paleopathology Association, Tempe, Arizona, Estados Unidos.

DORN PL, FLORES J, BRAHNEY B, GUTIÉRREZ A, ROSALES R, RODAS A, et al. 2001. Comparison of polymerase chain reaction on fresh tissue samples and fecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 96(4):503–5.

DOS SANTOS DM, TALVANI A, GUEDES PM, MACHADO-COELHO GL, DE LANA M, BAHIA MT. 2009. *Trypanosoma cruzi*: genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infection. *Exp. Parasitol.* 121:8–14.

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.

DUFFY T, CURA CI, RAMIREZ JC, ABATE T, CAYO NM, PARRADO R, BELLO ZD, VELAZQUEZ E, MUÑOZ-CALDERON A, JUIZ NA, BASILE J, GARCIA L, RIARTE A, NASSER JR, OCAMPO SB, YADON ZE, TORRICO F, DE NOYA BA, RIBEIRO I, SCHIJMAN AG. 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:e2000.10.1371.

EGAÑA C, VERGARA F, CAMPOS R, ORTIZ S, BOTTO C, SOLARI A. 2014. *Trypanosoma cruzi* infection in *Mepraia gajardoi* and *Mepraia spinolai*: the effect of feeding nymphs from the field. *Am J Trop Med Hyg.* 91(3):534–6.

ELIAS MC, VARGAS NS, ZINGALES B, SCHENKMAN S. 2003. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129:1–9.

ENRIQUEZ GF, BUA J, OROZCO MM, WIRTH S, SCHIJMAN AG, GÜRTLER RE, *et al.* 2014. High levels of *Trypanosoma cruzi* DNA determined by qPCR and infectiousness to *Triatoma infestans* support dogs and cats are major sources of parasites for domestic transmission. *Infect Genet Evol.* 25:36–43.

FERREIRA L, BRITTO C, CARDOSO M, FERNANDES O, REINHARD K, ARAÚJO A. 2000. Paleoparasitology of Chagas disease revealed by infected tissues from Chilean mummies. *Act Trop.* 75:79-84.

FREITAS JL. 1961. Diagnóstico de laboratório da moléstia de Chagas. *Bol. Of. Sanit. Panamer.* 51:429–38.

FRÍAS D, HENRY A, GONZÁLEZ CH (1998). *Mepraia gajardoi*: a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Rev Chil Hist Nat.* 71: 177-188.

GARCÍA ES, GENTA FA, DE AZAMBUJA P, SCHAUB GA. 2010. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 26(10):499–505.

GOBIERNO DE CHILE. MINISTERIO DE SALUD. 2000. Unidad de Medicina Transfusional. Norma para la selección de donantes de Sangre.

- GUMIEL M, DA MOTA FF, RIZZO V DE S, SARQUIS O, DE CASTRO DP, LIMA MM, *et al.* 2015. Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. *Parasit Vectors*. 8:245.
- GUZZETTI S, IOSA D, PECIS M, BONURA L, PROSDOCIMI M, MALLIANI A. 1991 Impaired heart rate variability in patients with chronic Chagas' disease. *Am Heart J*. 121(6 Pt 1):1727–1734.
- HERRERA L. 2010. Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Bol Mal Salud Amb*. v.50 n.1.
- JUNQUEIRA A, CHIARI E, WINCKER P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 90(2):129-132.
- JUNQUEIRA LF Jr. 2012. Insights into the clinical and functional significance of cardiac autonomic dysfunction in Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 45(2):243–252.
- KOLLIEN AH, SCHAUB GA. 1998. The development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the reduviid bug *Triatoma infestans* (Insecta): influence of starvation. *J Eukaryot Microbiol*. 45(1):59–63.
- KOLLIEN AH, SCHAUB GA. 2000. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatomine. *Parasitol Today*. 16: 381-87.
- LIMA VS, JANSEN AM, MESSENGER LA, MILES MA, LLEWELLYN MS. 2014. Wild *Trypanosoma cruzi* I genetic diversity in Brazil suggests admixture and disturbance in parasite populations from the Atlantic Forest region. *Parasit Vectors*. 7:263.
- LORCA M, GARCIA A, CONTRERAS M, SCHENONE H, ROJAS, A. 2001. Evaluation of a *Triatoma infestans* elimination program by the decrease of *Trypanosoma cruzi* infection frequency in children younger than 10 years, Chile, 1991-1998. *Am J Trop Med Hyg*. 65:861-864.
- MAGUIRE J, MOTT K, SOUZA J, ALMEIDA E, RAMOS N, GUIMARAES A. 1982 Electrocardiographic classification and abbreviated lead system for population-based studies of Chagas' disease. *Bol PAHO*. 16(1):47-58.
- MEJÍA AM, TRIANA O. 2005. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* in blood and organs of infected mice determined by LSSP-PCR. *Biomedica*. 25:76–86.

MELLO R, SZARF G, SCHVARTZMAN P, NAKANO E, ESPINOSA , SZEJNFELD D, FERNANDES V, LIMA J, CIRENZA C, DE PAOLA A. 2012. Delayed enhancement cardiac magnetic resonance Imaging can identify the risk for ventricular tachycardia in chronic Chagas' heart disease. *Arq Bras Cardiol.* 98(5):421–430.

MOREIRA OC, RAMÍREZ JD, VELÁZQUEZ E, MELO MF, LIMAFERREIRA C, GUHL F, SOSA-ESTANI S, MARIN-NETO JA, MORILLO CA, BRITTO C. 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 125(1):23-31

NOIREAU, F. 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. In *Chagas la enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del programa de control.* Ministerio de Salud y Previsión Social. pp 17-47.

NOYA B, DÍAZ Z, COLMENARES C, RUIZ R, MAURIELLO L, MUÑOZ A, NOYA O. 2015. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem do Inst Oswaldo Cruz.* 110(3):377-386.

ODA E, SOLARI A, BOTTO-MAHAN C. 2014. Effects of mammal host diversity and density on the infection level of *Trypanosoma cruzi* in sylvatic kissing bugs. *Med Vet Entomol.* 28(4):384–90.

OMS. 1999. Guía de Evaluación de la Certificación de la Interrupción de la Transmisión vectorial del *Trypanosoma cruzi*. Santiago, Chile. Doc OPS/HCP/HCT/135-99.

OMS. 2000. La enfermedad de Chagas interrumpida en Chile . TDR Noticias 61 : 10

OPS. 2006. XV^a Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión de la tripanosomiasis americana por transfusión. INCOSUR-Chagas. Brasilia 6 al 9 de Junio.

ORTIZ S, ZULANTAY I, SOLARI A, BISIO M, SCHIJMAN A, CARLIER Y, APT W. 2012. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Trop.* 124:243–246.

ORTIZ S, ZULANTAY I, APT W, SAAVEDRA M, SOLARI A. 2015. Transferability of *Trypanosoma cruzi* from mixed human host infection to *Triatoma infestans* and from insects to axenic culture. *Parasitol Int.* 64(1):33–6.

PINTO AS, DE LANA M, BASTRENTA B, BARNABÉ C, QUESNEY V, NOËL S, *et al.* 1998. Compared vectorial transmissibility of pure and mixed clonal genotypes of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*. *Parasitol Res.* 84(5):348–53.

PINTO J. 2006. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características biológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 39: 370- 375.

PINTO P, AMATO NETO V, DO NASCIMENTO S, DE SOUZA H, MIYAMOTO A, MOREIRA A, BRAZ L. 1990. Viability of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane juice. Rev Inst Med Trop. 32(5):325-327.

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. 103:195–200.

PIZARRO JC, LUCERO D, STEVENS L. 2007. A method for the identification of guinea pig blood meal in the Chagas disease vector *Triatoma infestans*. Kinetoplastid Biol Dis. 6:1.

QVARNSTROM Y, SCHIJMAN AG, VERON V, AZNAR C, STEURER F, DA SILVA AJ. 2012. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. PLoS Negl. Trop. Dis. 6:e1689.10.1371.

RAADSCHILDERS L, ROCHA M, SOUSA L, NOUWEN J, RIBEIRO A. 2014. Is autonomic function associated with left ventricular systolic function in Chagas heart disease patients undergoing treatment for heart failure? Rev Soc Bras Med Trop. 47(2):239–242.

RASSI JR A, RASSI A, MARCONDES DE REZENDE J. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease).

REQUENA JM, LÓPEZ MC, ALONSO C. 1996. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today. 12:279–283.

REQUENA-MÉNDEZ A, LÓPEZ MC. 2013. Angheben A. Evaluating Chagas disease progression and cure through blood-derived biomarkers: a systematic review. Expert Rev Anti Infect Ther. 11:957–976.

RIBEIRO A, MORAES R, RIBEIRO J, FERLIN E, TORRES R, OLIVEIRA E, ROCHA M. 2001. Parasympathetic dysautonomia precedes left ventricular systolic dysfunction in Chagas disease. Am Heart J. 141(2):260–265.

RIBEIRO A, CAVALVANTI P, LOMBARDI F, NUNES MDO C, BARROS M, ROCHA M. 2008. Prognostic value of signal-averaged electrocardiogram in Chagas disease. J Cardiovasc Electrophysiol. 19(5):502–509.

RIBEIRO A, CASSINI P, PEIXOTO S, LIMA-COSTA M. 2011. Vagal impairment in elderly Chagas disease patients: a population-based study (The Bambui Study). *Int J Cardiol.* 147(3):359–365.

RODRÍGUEZ-MORALES A. 2008. Chagas disease: An emerging food-borne entity? *Journal of Infection in Developing Countries* 2: 149-150.

ROTHHAMMER F, ALLISON MJ, NÚÑEZ L, STANDEN V, ARRIAZA B. 1985. Chagas' disease in pre-Columbian South America. *Am J Phys Anthropol.* Dec 68(4):495-8.

RUSSOMANDO G, DE ARIAS A, ALMIRON M, FIGUEREDO A, FERREIRA ME, MORITA K. 1996. *Trypanosoma cruzi*: polymerase chain reaction-based detection in dried feces of *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol.* 83(1):62-66.

SAAVEDRA M, ZULANTAY I, APT W, MARTÍNEZ G, ROJAS A, RODRÍGUEZ J. 2013. Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without *previous microscopic observation is a useful tool to detect viable Trypanosoma cruzi*. *Biol Res.* 46(3): 295-8.

SAAVEDRA M, ZULANTAY I, APT W, CASTILLO J, ARAYA E, MARTÍNEZ G, RODRÍGUEZ J. 2016. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors.* 4;9(1):382.

SABINO C, RIBEIRO A, LEE T, OLIVEIRA C, CARNEIRO-PROIETTI A, ANTUNES A, MENEZES M, LANNI B, SALEMI V, NASTARI L, FERNANDES F, SACHDEV V, CARRICK D, DENG X, WRIGHT D, GONCALEZ T, MURPHY E, CUSTER B, BUSCH M. 2015. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. *Eur J Heart Fail.* 17(4):416-23.

SANTANA RA, MAGALHÃES LK, MAGALHÃES LK, PRESTES SR, MACIEL MG, DA SILVA GA, *et al.* 2014. *Trypanosoma cruzi* strain TcI is associated with chronic Chagas disease in the Brazilian Amazon. *Parasit Vectors.* 7:267.

SCHAUB GA. 1989. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol.* 68(3):260–73.

SCHAUB GA, BÖKER CA 1987. Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* studied by scanning electron microscopy: influence of blood uptake by the bug. *Parasitol Res.* 73: 417-420.

SCHENONE H. 1999. Xenodiagnosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 94(Suppl 1):289–294.

SCHENONE H, ROJAS A. 1999. Longitudinal study, by xenodiagnosis, of parasitemia in patients with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Bol Chil Parasitol. 54(1-2):29-32.

SCHENONE H, CRISTENSEN H, DE VASQUEZ A, GONZALEZ C, MENDEZ E, ROJAS A, VILLARROEL F. 1985. Fuentes de alimentación de triatomas domésticos y su influencia epidemiológica en relación a enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. Bol Chil Parasitol. 40:34-38.

SCHENONE H, CONTRERAS M. DEL C, SALINAS P, SANDOVAL L, ROJAS A, VILLARROEL F. 1995. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Frecuencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* por grupo de edad y por regiones. Bol Chil Parasitol. 50:84-86.

SCHIJMAN AG, BISIO M, ORELLANA L, SUED M, DUFFY T, MEJIA JARAMILLO AM, CURA C, AUTER F, VERON V, QVARNSTROM Y, DEBORGGRAEVE S, HIJAR G, ZULANTAY I, LUCERO RH, VELAZQUEZ E, TELLEZ T, SANCHEZ LEON Z, GALVÃO L, NOLDER D, MONJE RUMI M, LEVI JE, RAMIREZ JD, ZORRILLA P, FLORES M, JERCIC MI, CRISANTE G, AÑEZ N, DE CASTRO AM, GONZALEZ CI, ACOSTA VIANA K, YACHELINI P, TORRICO F, ROBELLO C, DIOSQUE P, TRIANA CHAVEZ O, AZNAR C, RUSSOMANDO G, BÜSCHER P, ASSAL A, GUHL F, SOSA ESTANI 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:e931

SILBER A, BÚA J, PORCEL B, SEGURA E, RUIZ A. 1997. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. Exp Parasitol. 85(3):225-232.

STERNICK EB1, MARTINELLI M, SAMPAIO R, GERKEN LM, TEIXEIRA RA, SCARPELLI R, SCANAVACCA M, NISHIOKA SD, SOSA E. 2006. Sudden cardiac death in patients with Chagas heart disease and preserved left ventricular function. J Cardiovasc Electrophysiol. 17(1):113–116 .

STRAUSS D, CARDOSO S, LIMA J, ROCHITTE C, WU K. 2011. ECG scar quantification correlates with cardiac magnetic resonance scar size and prognostic factors in Chagas' disease. Heart. 97(5):357–361.

STURM NR, DEGRAVE W, MOREL C, SIMPSON L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast

minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.* 33:205–214.

TARLETON RL, CURRAN JW. 2012. Is Chagas disease really the "new HIV/AIDS of the Americas" *PLoS Negl Trop Dis.* 6(10):e1861.

TIBAYRENC M. 2003. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 28;2(1):12.

TIBAYRENC M, WARD P, MOYA A, AYALA F. 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci.* 83:115-119.

TOLEDO MJ, BAHIA MT, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO OA, TIBAYRENC M, BARNABÉ C, TAFURI WL, DE LANA M. 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:223–230.

URBINA JA. 2015. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol.* 62:149–156.

VENEGAS J, MIRANDA S, COÑOEPAN W, PÎCHUANTES S, JERCIC MI, GONZÁLEZ C, GAJARDO M, APT W, ARRIBADA A, SÁNCHEZ G. 2010. Microsatellite marker analysis shows differentiation among *Trypanosoma cruzi* populations of peripheral blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on the same chronic Chagasic patients: microsatellite marker analysis and *T. cruzi*. *Parasitol Res.* 107(4):855–63.

VILLAR JC, LEON H, MORILLO CA. 2004. Cardiovascular autonomic function testing in asymptomatic *Trypanosoma. cruzi* carriers: a sensitive method to identify subclinical Chagas' disease. *Int J Cardiol.* 93(2–3):189–195.

VIRREIRA M, TORRICO F, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, SOLANO M, CARLIER Y, SVOBODA M. 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68:574–582.

WENDEL S, BRENER Z, CAMARGO ME, RASSI A. 1992. Chagas disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. Sao Paulo. ISBT 1-3.

ZINGALES, B.; MILES, M.; CAMPBELL, D.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.; TEIXEIRA, M.; SCHIJMAN, A.; LLEWELLYN, M.; SILVA, E.; MACHADO, C.; ANDRADE, S.; STURM, N. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect. Genet. Evol. pp. 240-253.

ZULANTAY, I.; APT, W.; RODRÍGUEZ, J.; VENEGAS, J.; SÁNCHEZ, G. 1998. Evaluación serológica del tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica con Alopurinol e Itraconazol. Rev. Med. Chile. 126:265-270.

ZULANTAY I, BOZAN F, SALAS C, ZILLERUELO N, OSUNA A, GIL L, RODRÍGUEZ J, ROJAS A, EGEA J, APT W. 2004. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliaria y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. Parasitol Latinoam. 59:93-8.

ZULANTAY I, APT W, GIL LC, ROCHA C, MUNDACA K, SOLARI A, SANCHEZ G, RODRIGUEZ C, MARTINEZ G, DE PABLOS LM, SANDOVAL L, RODRIGUEZ 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. 101:673–679.

ZULANTAY I, APT W, VALENCIA C, TORRES A, SAAVEDRA M, RODRÍGUEZ J, et al. 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. J Antim Chemother. 66(10):2224–6.

AGRADECIMIENTOS

ESTA INVESTIGACIÓN HA SIDO FINANCIADA POR LOS PROYECTOS FONDECYT 1120382-1161485 Y FUE DESARROLLADA EN EL LABORATORIO DE PARASITOLOGÍA BÁSICO-CLÍNICO DEL PROGRAMA DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BIOMÉDICAS DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

XI. ANEXOS

- Acta de aprobación proyecto de investigación en seres humanos (Anexo 01)

- Consentimiento informado (Anexo 02)

Anexo 01. Acta de Aprobación Comité de Ética Proyecto Fondecyt 1120382.-



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



30 JUN. 2011

1/2

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

Con fecha 28 de junio de 2011, 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 O., Médico Genetista
Sra. Nina Horwitz C., Sociólogo, Mg. Bioética
Dra. María Eugenia Pinto C., Médico Infectólogo
Sra. Claudia Marshall F., Representante de la comunidad

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"GENOTYPES AND PARASITOLOGICAL LOAD AS RISK FACTORS IN THE DEVELOPMENT OF CARDIOPATHY IN PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE"** y cuyo investigador responsable es el **Dr. Werner Apt**, quien desempeña funciones en el **Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico, Programa Disciplinario 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 de aceptación de las autoridades de la institución en que se realizará el estudio*
- *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



30 JUN 2011

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: Población no cautiva, investigación no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Proyecto útil, investigará la carga parasitaria y el linaje de *trypansomoma cruzi* en enfermedades de chagas crónica ya diagnosticada.
- c) Riesgos y Beneficios: Riesgos mínimos, beneficios posiblemente predecir el curso de la enfermedad
- d) Protección de los participantes: Consentimiento Informado protege a los participantes.
- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: no aplica.
- 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 10 de junio de 2011, 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.

Santiago, 30 de junio de 2011.



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

MGH/mva.
c.c.: Archivo Proy. 048-2011

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

Anexo 02. Consentimiento Informado Comité Ética Proyecto Fondecyt 1120382


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


30 JUN. 2011

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**GENOTIPOS Y CARGA PARASITARIA COMO FACTORES DE RIESGO
EN EL DESARROLLO DE CARDIOPATIA EN PACIENTES
CON ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Nombre del Investigador Responsable: **DR. WERNER APT B.**
Institución: **UNIVERSIDAD DE CHILE**
Teléfonos: **9786122**

Estimado paciente.....

En la pesquisa de la infección por la enfermedad de Chagas en personas de la IV Región realizada por nosotros en los últimos años, hemos confirmado por exámenes de sangre que Ud. tiene la enfermedad de Chagas, resultado que le hemos entregado por escrito.

Por este motivo, siempre y cuando Ud. acepte y cumpla los requisitos que se señalan a continuación, le invitamos a participar en un estudio para determinar la **seriedad** de la enfermedad de Chagas que Ud. presenta, si existe compromiso del corazón y conocer la **agresividad** del agente que le produjo la infección.

Si usted acepta participar será sometido(a) a los siguientes procedimientos:

Una vez al año durante el estudio

- 1.-Se le extraerán 10cc de sangre periférica (que equivalen aproximadamente a dos cucharaditas) para efectuar: estudio serológico y parasitológico (kPCR, qPCR y ensayos de hibridación)
- 2.-Se le aplicará xenodiagnóstico, que consiste en colocar en su antebrazo dos cajitas con vinchucas libres de infección durante 15 minutos.
- 3.-Se le efectuará un electrocardiograma
- 4.-Si presenta alteración al ECG, se les efectuará Radiografía de Tórax y Echo Doppler
- 4.- Sería atendido(a) por médico parasitólogo



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



De acuerdo al resultado de los exámenes de laboratorio y al examen físico realizado a usted:

- 1.- Será informado si presenta o no compromiso del corazón
- 2.- A los pacientes que presentan alteraciones del ECG y/o síntomas por compromiso del corazón, se les tomará una radiografía de tórax para ver el tamaño del corazón y una ecografía cardiaca (echo doppler) para determinar el funcionamiento de ese órgano.

Costo del estudio: Todos los exámenes y la atención de los médicos especialistas serán sin costo para Ud.

Beneficios del estudio: Su participación en este estudio le permitirá conocer el grado de avance de su enfermedad, de modo tal que al término de esta investigación usted será tratado con nifurtimox (Lampit Bayer ®) aportado por el Ministerio de Salud que le será administrado de acuerdo al Protocolo sobre la enfermedad de Chagas disponible en los hospitales de la región.

Compensación por participar en este estudio: Usted no recibirá compensación económica alguna por formar parte de este estudio.

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, sin que ello signifique modificaciones en el estudio y tratamiento habitual de su enfermedad. Del mismo modo su médico tratante o el investigador podrán determinar su retiro de la investigación si considera que esa decisión va en su beneficio.

Información adicional entregada a usted o a su médico: Ambos serán informados si durante el desarrollo de estudio surgen nuevos conocimientos o condiciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en esta investigación.



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



Resguardo de las muestras biológicas: serán almacenadas en congeladores del Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y la responsable de las muestras será la Dra. Inés Zulantay Alfaro (56-2-9786753). 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.

Derechos del participante: Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede llama a:

DR. WERNER APT B. Investigador Responsable
 Teléfonos/Fax: (56-2) 9786122

Conclusiones:

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 del estudio y si cumplo los requisitos recibir tratamiento con nifurtimox al término del estudio, del cuál también será responsable el Dr. Werner Apt.

_____	_____	_____
Nombre del participante	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre del informante	Firma	Fecha
DR. WERNER APT B.	_____	_____
Nombre del investigador	Firma	Fecha

Si se trata de un(a) paciente incompetente, registrar nombre del paciente y de su apoderado.