



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS

ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO



**PROGRAMA DE MAGÍSTER
EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS**

**CONDICIÓN PARASITOLÓGICA DE INDIVIDUOS
CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA EVALUADOS
EN CONDICIONES DE PRE Y POSTERAPIA CON NIFURTIMOX**

NICOLÁS ALEJANDRO BRAVO VÁSQUEZ

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario y al
grado de Magíster en Ciencias
Animales y Veterinarias con Mención
en Patología Animal

PROFESOR GUÍA: INÉS A. ZULANTAY ALFARO

FINANCIAMIENTO: Proyecto FONDECYT 1100768

SANTIAGO, CHILE

2012

MEMORIA DE TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO Y DE GRADO DE
MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS

**“CONDICIÓN PARASITOLÓGICA DE INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS
CRÓNICA EVALUADOS EN CONDICIONES DE PRE Y POSTERAPIA
CON NIFURTIMOX”**

**“PARASITOLOGICAL CONDITION OF INDIVIDUALS WITH CHRONIC CHAGAS
DISEASE EVALUATED ON PRE AND POST-THERAPY CONDITIONS
WITH NIFURTIMOX”**

Nicolás Alejandro Bravo Vásquez *

*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 (ECh), causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, representa un importante problema de salud pública en Latinoamérica y, debido a la globalización, en países donde no existe el vector biológico. Los criterios de curación para evaluar la eficacia terapéutica durante la etapa crónica, no han sido hasta ahora, establecidos. La PCR en Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR) constituye una promisoriosa herramienta para monitorear la carga parasitaria en pacientes con ECh crónica, dado que éstos presentan parasitemias bajas y fluctuantes.

En esta tesis, se estandarizó la reacción de qPCR mediante el sistema de detección TaqMan® para la cuantificación de *T. cruzi*, junto con el desarrollo de un sistema de control interno endógeno (CIE) basado en la detección del cromosoma 12 humano (X12), que permite descartar resultados falsos negativos relacionados con ausencia de ADN en las muestras evaluadas mediante qPCR debido a pérdidas durante el proceso de extracción o problemas con la reacción interna de qPCR. Se evaluó además, la condición parasitológica mediante qPCR en 44 pacientes con ECh crónica en condiciones pre y post-terapia con Nifurtimox (NFX) y se comparó con las técnicas de xenodiagnóstico (XD), PCR convencional de muestras de deyecciones de triatominos de XD (PCR-XD) y sangre venosa (PCR-S).

La estandarización de la reacción de qPCR dirigida a la detección de *T. cruzi* tuvo como resultado una sensibilidad y especificidad del 92% y 100 %, respectivamente. Mientras que el sistema CIE basado en X12 permitió descartar resultados falsos negativos. En cuanto a la evaluación de eficacia quimioterapéutica de NFX mediante qPCR, fue posible determinar que el 86,36% del universo de individuos evaluados eliminó *T. cruzi* o persiste con parasitemias detectables de muy bajo nivel que no son cuantificables en el rango dinámico establecido (<1 parásito/mL). Estos resultados representan un hallazgo positivo, pues si bien la mayoría de las metodologías convencionales dan cuenta de la persistencia de *T. cruzi*, qPCR evidencia el real y actual nivel de parasitemia circulante, por lo que debería ser considerado el principal indicador de evaluación de eficacia quimioterapéutica en el tratamiento de la ECh crónica.

Palabras Claves: Enfermedad de Chagas crónica, *Trypanosoma cruzi*, PCR en Tiempo Real, Nifurtimox.

SUMMARY

Chagas disease (ChD), caused by the hemoflagellate protozoon *Trypanosoma cruzi*, is an important public health problem in Latin America, and due to globalization, also in countries where the biological vector does not exist. Cure criteria, to be able to evaluate the efficacy of therapy during the chronic stage, so far have not been established.

Real time PCR or quantitative PCR (qPCR) is a promising tool to monitor the parasite load in patients with chronic ChD, given that these patients have low and fluctuating parasitemia. In this thesis it was standardized the qPCR reaction using the TaqMan® detection system for the quantification of *T. cruzi*, along with the development of an endogenous internal control (EIC) system based on the detection of human chromosome 12 (X12), which eliminates false negative results related to the absence of DNA in samples evaluated with qPCR due to losses during the extraction process or problems with the internal reaction of qPCR. Furthermore, the parasitological condition of 44 patients with chronic ChD was evaluated using this method in pre and post-therapy conditions with Nifurtimox (NFX), and compared to the techniques of xenodiagnosis (XD), conventional PCR of dejection samples of XD triatomines (PCR-XD) and venous blood (PCR-B).

The standardization of the qPCR reaction directed to the detection of *T. cruzi* showed a sensitivity and specificity of 92% and 100%, respectively, while the EIC system based on X12 allowed discounting false negatives. In terms of the evaluation of the chemo-therapeutic efficacy of NFX, qPCR showed that 86.36% of the individuals evaluated eliminated *T. cruzi* or had detectable parasitemia of levels too low to be quantified in the dynamic range established (<1 parasite/mL). These results represent a positive finding, since although the majority of the conventional methods detect the persistence of *T. cruzi*, qPCR detects the real current level of circulating parasitemia; thus this method should be considered the principal indicator of the evaluation of the chemo-therapeutic efficacy in the treatment of chronic ChD.

Key Words: Chronic Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Real-time PCR, Nifurtimox.

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
SUMMARY	6
I. INTRODUCCIÓN.....	14
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	16
1. Enfermedad de Chagas.....	16
a. Epidemiología y distribución geográfica	16
b. Agente etiológico.....	17
c. Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	18
d. Ciclo de vida y transmisión de <i>T. cruzi</i>	18
e. Aspectos clínicos	22
f. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	23
Diagnóstico serológico.....	23
Diagnóstico parasitológico.....	23
Diagnóstico parasitológico molecular: Reacción de la polimerasa en cadena	25
g. Tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	27
2. PCR en Tiempo Real y su aplicación en la enfermedad de Chagas crónica	29
a. Generalidades.....	29
b. Detección genérica: SYBR® Green	30
c. Detección específica: Sondas TaqMan®	30
d. qPCR aplicado al estudio de la enfermedad de Chagas	31
III. HIPÓTESIS	32
IV. OBJETIVO GENERAL	32
V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. Población en estudio.....	33
2. Selección de la muestra de estudio.....	33
3. Tratamiento con Nifurtimox	34

4. Técnicas parasitológicas	34
4.1. Xenodiagnóstico	34
4.2. PCR convencional en muestras de deyecciones y sangre periférica	35
4.2.1. Muestras de deyecciones de triatominos de xenodiagnóstico para PCR.....	35
4.2.2. Muestras de sangre periférica de individuos con y sin enfermedad de Chagas crónica	35
4.2.3. Purificación de ADN presente en las muestras de deyecciones de XD y sangre venosa	35
4.2.4. Reacción de PCR con partidores ADNk- <i>T. cruzi</i>	37
4.3. PCR Tiempo Real de muestras de sangre periférica mediante sistema TaqMan®	37
4.3.1. Obtención de ADN de <i>T. cruzi</i>	38
4.3.2. Purificación de ADN de <i>T. cruzi</i>	39
4.3.3. Cuantificación de ADN de <i>T. cruzi</i>	39
4.3.4. Cuantificación de ADN humano	40
4.3.5. Curva estándar de ADN de <i>T. cruzi</i> y ADN humano	40
4.3.6. Reacción de qPCR para <i>T. cruzi</i> y X12 con sistema de detección TaqMan®.	41
5. Análisis estadístico	45
6. Medidas de bioseguridad.....	47
VII. RESULTADOS.....	48
1. Estandarización de la reacción de qPCR para <i>T. cruzi</i> y X12 mediante sistema de detección TaqMan®.....	48
1.1 Cuantificación de ADN parasitario y ADN humano	48
1.2 Reacción de qPCR para la detección de <i>T. cruzi</i>	50
1.3 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de la reacción de qPCR para la detección de <i>T. cruzi</i>	54
1.4 Reacción de qPCR para la detección de X12	55
2. Evaluación pre y post-terapia de pacientes con enfermedad de Chagas.....	58
2.1 Grupo xenodiagnóstico positivo.....	58
2.1.1 Xenodiagnóstico.....	58
2.1.2 PCR-XD.....	59
2.1.3 PCR-S.....	61
2.1.4 Cuantificación de <i>T. cruzi</i> mediante qPCR y control X12.....	62
2.2 Grupo xenodiagnóstico negativo	64

2.2.1	Xenodiagnóstico.....	64
2.2.2	PCR-XD.....	65
2.2.3	PCR-S.....	66
2.2.4	Cuantificación de <i>T. cruzi</i> mediante qPCR y control X12.....	68
2.3	Análisis estadístico	70
2.3.1	Concordancia entre metodologías diagnósticas cualitativas dentro de grupos	70
2.3.2	Comparaciones entre metodologías diagnósticas cualitativas pre y post-terapia.....	74
2.3.3	Comparaciones entre pruebas parasitológicas cuantitativas	77
VIII.	DISCUSIÓN.....	80
1.	Estandarización de la reacción de qPCR para la cuantificación de <i>T. cruzi</i> en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.....	80
2.	Condición parasitológica evaluada mediante qPCR de pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.....	84
IX.	CONCLUSIONES.....	89
X.	BIBLIOGRAFÍA	91
XI.	ANEXO	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Equivalencias en distintas unidades de masa de ADN de <i>T. cruzi</i> para una determinada concentración de parásitos.	40
Tabla 2: Resultado de cuantificación de ADN total de <i>T. cruzi</i> mediante el kit Accublu TM High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).....	49
Tabla 3: Resultado de cuantificación de ADN humano total mediante el kit Accublu TM High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).....	50
Tabla 4: Tabla de contingencia para qPCR <i>T. cruzi</i> , según resultado diagnóstico	54
Tabla 5: Resultados del xenodiagnóstico pre y post-terapia del grupo XD (+), según período de observación	59
Tabla 6: Resumen de resultados de PCR-XD pre y post-terapia grupo XD (+).....	60
Tabla 7: Resumen de resultados de PCR-S pre y post-terapia grupo XD (+)	62
Tabla 8: Resultados de qPCR para <i>T. cruzi</i> y control X12 del grupo XD (+).....	63
Tabla 9: Resultados de xenodiagnóstico pre y post-terapia del grupo XD (-), según período de observación	64
Tabla 10: Resumen de resultados de PCR-XD pre y post-terapia grupo XD (-).....	66
Tabla 11: Resumen de resultados de PCR-S pre y post-terapia grupo XD (-)	67
Tabla 12: Resultados de qPCR para <i>T. cruzi</i> y control X12 del grupo XD (-).....	69
Tabla 13: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (+), según condición parasitológica al PCR-XD pre y post-terapia con Nifurtimox.	76
Tabla 14: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (-), según condición parasitológica al PCR-XD pre y post-terapia con Nifurtimox.	76
Tabla 15: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (+), según condición parasitológica al PCR-S pre y post-terapia con Nifurtimox.	76
Tabla 16: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (-), según condición parasitológica al PCR-S pre y post-terapia con Nifurtimox.....	76
Tabla 17: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (+), según condición parasitológica al qPCR pre y post-terapia con Nifurtimox.	77
Tabla 18: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (-), según condición parasitológica al qPCR pre y post-terapia con Nifurtimox.	77
Tabla 19: Tabla Operacional.....	99

Tabla 20: Consolidado de resultados grupos XD (+) y XD (-) en condiciones pre-terapia con Nifurtimox.....	100
Tabla 21: Consolidado de resultados grupos XD (+) y XD (-) en condiciones post-terapia con Nifurtimox.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Metodología de dilución. A partir de un tubo inicial que contiene ADN equivalente a una concentración de 1×10^6 /mL, se preparan diluciones seriadas de orden 10.	41
Figura 2: Curva estándar a partir de formas epimastigotas completas de <i>T. cruzi</i> para la reacción de qPCR con sistema de detección SYBR® Green.	42
Figura 3: Curva de melting de los estándares de <i>T. cruzi</i> evaluados bajo el sistema de detección SYBR® Green.....	43
Figura 4: Curva estándar de cuantificación de ADN total de <i>T. cruzi</i> mediante el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).....	48
Figura 5: Curva estándar de cuantificación de ADN humano total mediante el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).....	49
Figura 6: Curva de amplificación de los 6 estándares de ADN de <i>T. cruzi</i> 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.....	51
Figura 7: Curva de amplificación de los 6 estándares de ADN de <i>T. cruzi</i> generados considerando los controles de reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.	52
Figura 8: Curva estándar a partir de ADN de <i>T. cruzi</i> para la reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.....	53
Figura 9: Curva de amplificación de los 5 estándares de ADN humano generados mediante reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.....	55
Figura 10: Curva de amplificación de los 5 estándares de ADN humano generados mediante reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan® considerando los controles de reacción.	56
Figura 11: Curva estándar de ADN humano (X12) para qPCR.....	57
Figura 12: PCR-XD pre y post-terapia del grupo XD (+).....	60
Figura 13: Resultados de PCR-S pre y post-terapia del grupo XD (+).....	61
Figura 14: Resultados de PCR-XD pre y post-terapia del grupo XD (-).....	65
Figura 15: Resultados de PCR-S pre y post-terapia del grupo XD (-).....	67

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Porcentaje de individuos del grupo XD (+) positivos a <i>T. cruzi</i> en pre-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica	70
Gráfico 2: Porcentaje de individuos del grupo XD (+) positivos a <i>T. cruzi</i> en post-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica	71
Gráfico 3: Porcentaje de individuos del grupo XD (-) positivos a <i>T. cruzi</i> en pre-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica	72
Gráfico 4: Porcentaje de individuos del grupo XD (-) positivos a <i>T. cruzi</i> en post-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica	73
Gráfico 5: Porcentaje de individuos del grupo XD (+) positivos a <i>T. cruzi</i> , según técnica parasitológica diagnóstica y momento de evaluación	74
Gráfico 6: Porcentaje de individuos del grupo XD (-) positivos a <i>T. cruzi</i> , según técnica parasitológica diagnóstica y momento de evaluación	75
Gráfico 7: Condición de individuos pertenecientes al grupo XD (+) evaluados en post-terapia mediante qPCR, según situación de parasitemia.	78
Gráfico 8: Condición de individuos pertenecientes al grupo XD (-) evaluados en post-terapia mediante qPCR, según situación de parasitemia.	79
Gráfico 9: Condición de individuos pertenecientes a ambos grupos evaluados en post-terapia mediante qPCR, según situación de parasitemia.	79

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh) o Tripanosomiasis Americana, es una zoonosis parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La parasitosis 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 y, debido a la globalización, un problema emergente en países donde no existe el vector biológico. 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 áreas rurales y periurbanas de las provincias de Atacama y Coquimbo son consideradas hiperendémicas (Apt *et al.*, 2005).

En su ciclo biológico, la ECh requiere de la participación de vectores biológicos y mamíferos silvestres para su transmisión. En nuestro país, se ven implicados en la diseminación de la parasitosis los insectos triatomínicos *Triatoma infestans*, *Mepraia spinolai* y *Mepraia gajardoi* (Apt *et al.*, 2008). Otros mecanismos de transmisión lo constituyen la infección congénita, accidentes de laboratorio, transfusiones sanguíneas (Moncayo, 2003) y la ingesta de alimentos contaminados con deyecciones de triatomínicos (Apt *et al.*, 2008).

La ECh se manifiesta en tres fases clínicas: aguda, con altas parasitemias, crónica indeterminada y crónica determinada, esta última caracterizada por parasitemias bajas y fluctuantes. Debido a esto, no todos los métodos diagnósticos convencionales descritos para la ECh son útiles en todas sus fases clínicas. En la fase aguda, los métodos de elección son los parasitológicos directos, tales como hemocultivo y xenodiagnóstico (XD), sólo disponibles en laboratorios de investigación. En la fase crónica en tanto, los exámenes serológicos como ELISA e Inmunofluorescencia Indirecta son los más recomendados (Zulantay *et al.*, 1998). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha evidenciado ser una técnica capaz de mejorar considerablemente la sensibilidad de detección de *T. cruzi* en las etapas aguda y crónica, en comparación con hemocultivo y XD, métodos cualitativos que no permiten estimar la carga parasitaria. Frente a esto, la técnica de PCR en Tiempo Real o PCR cuantitativa (qPCR), representa una alternativa emergente y atractiva, ya que no solo detecta el parásito en términos cualitativos, sino que además es capaz de cuantificar los niveles de material genético presentes

en una muestra biológica, constituyéndose de esta manera en una valiosa herramienta para evaluar los niveles de *T. cruzi* en pacientes con ECh crónica, especialmente en condiciones pre y post-terapia, lo que permitiría evaluar la eficacia de los fármacos antichagásicos.

Existe consenso internacional que la ECh debe ser tratada siempre, a excepción de algunos casos de *Core Bovis*, insuficiencia cardíaca terminal, y otros. Los únicos fármacos que por razones éticas y de eficacia se utilizan en la ECh humana son el Nifurtimox (NFX) y Benznidazol (BNZ), ambos con efectos colaterales y acceso limitado (Apt y Zulantay 2011). En nuestro país es posible disponer solamente de NFX para el tratamiento de esta afección.

En esta tesis, se cuantificó la carga parasitaria de 44 pacientes con ECh crónica en condiciones pre y post-terapia con NFX. Para ello, se estandarizó y aplicó la técnica de qPCR mediante el sistema de detección TaqMan® junto con el desarrollo de un sistema control interno exógeno (CIE) basado en la detección del cromosoma 12 humano (X12). Los resultados obtenidos fueron contrastados con otras técnicas parasitológicas, tales como XD (Schenone, 1999), PCR de deyecciones de XD (PCR-XD) (Zulantay *et al.*, 2011) y sangre (PCR-S) (Zulantay *et al.*, 2007), con el fin de evaluar la eficacia quimioterapéutica de NFX.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (ECh), fue descrita por primera vez en Minas Gerais, Brasil, en 1909, por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Es reconocida por la OMS como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas a nivel mundial (Hotez *et al.* 2007). El agente etiológico de esta enfermedad es el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual está distribuido ampliamente en animales silvestres y domésticos de zonas rurales y periurbanas de América.

a. Epidemiología y distribución geográfica

La ECh aún representa un importante desafío para la salud pública en Latino América, donde se estima que entre 8 y 10 millones de personas están infectadas con *T. cruzi*. Este último se encuentra restringido al sur, centro y algunas zonas de Norte América (México y Estados Unidos). Las islas del Caribe están libres de ECh. En zonas rurales de Latinoamérica, viviendas con características inapropiadas han demostrado favorecer la infestación con el vector. Históricamente, la transmisión y morbilidad han estado concentradas en esta región, aunque las migraciones han llevado a individuos crónicamente infectados hacia ciudades dentro y fuera de Latinoamérica, lo que ha determinado que la ECh sea en la actualidad, un problema de salud pública a nivel mundial. Entre 10.000 y 14.000 muertes ocurren al año a causa de la ECh. Estas estimaciones han disminuido notablemente debido a la implementación de programas exitosos de control del vector, monitoreo en bancos de sangre y acciones educativas dirigidas a la población en riesgo. La Iniciativa del Cono Sur se inició en el año 1991 y consideró a las naciones del cono sureste de América del Sur (Uruguay, Paraguay, Bolivia, Brasil, Chile y Argentina) (Moncayo *et al.*, 2003). A finales de la década de 1990, Chile y Uruguay fueron declarados libres de la transmisión vectorial intra-domiciliaria por *T. infestans*. En la actualidad, el monitoreo a nivel de bancos de sangre se aproxima al 100% en la mayoría de los países endémicos de la enfermedad. Las prevalencias más altas de ECh han sido reportadas en Bolivia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) y Paraguay (2,5%). Sin embargo, Brasil y México (cada uno con

prevalencias cercanas al 1%) junto con Argentina, son responsables de casi el 60% del universo de personas infectadas con *T. cruzi* en Latinoamérica (Rassi Jr *et al.*, 2012). Chile, presenta un área endémica de la parasitosis, donde existen alrededor de 150.000 personas infectadas, distribuida en áreas rurales y periurbanas de las ocho primeras regiones, incluida la Región Metropolitana, siendo consideradas hiperendémicas la regiones de Atacama y Coquimbo (Apt *et al.*, 2005; MINSAL, 2011).

b. Agente etiológico

T. cruzi pertenece al Reino Protista, Subreino Protozoa, Phylum Sarcomastigophora, Subphylum Matisgophora, Clase Zoomastigophorea, Orden Kinetoplastida (Rassi Jr *et al.*, 2012). Como otros miembros de la Familia Trypanosomatidae, se caracteriza por la existencia en su única mitocondria de una estructura llamada kinotoplasto. El material genómico de *T. cruzi* está situado en dos compartimientos celulares bien definidos; núcleo y kinetoplasto. El ADN kinetoplastídico (kADN) representa cerca del 20% del ADN total del parásito y está formado por minicírculos (1.4 kpb) y maxicírculos (20 kpb) de ADN encadenados formando una compleja red compacta (Brener *et al.*, 2000). Existen al menos 50 copias idénticas de maxicírculos que son similares al ADN mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican ARNs ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP en la mitocondria (Simpson, 1987). Los minicírculos existen en número variable (entre 3.000 y 30.000 copias), pudiendo haber heterogeneidad de secuencia entre los minicírculos de cada clon de *T. cruzi*. Cada minicírculo presenta cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre sí y con un tamaño cercano a las 120 pb y representan los orígenes de replicación de los minicírculos (Kitchin *et al.*, 1985). Así también, contiene cuatro regiones hipervariables en secuencias de tamaño cercano a 250 pb (Ray, 1989; Sheline y Ray, 1989).

c. Diversidad genética de *T. cruzi*

En la actualidad, se utiliza un sistema de nomenclatura para *T. cruzi* acordado en el “Second Satellite Meeting” (agosto 2009, Brasil), en un esfuerzo por unificar la nomenclatura existente de *T. cruzi*. La finalidad de este acuerdo fue la creación de un nuevo consenso para la clasificación de este parásito, facilitando así el estudio y reconocimiento por parte de los investigadores dedicados al conocimiento de la ECh. Este consenso es de especial relevancia para estudios relacionados con la epidemiología molecular de este parásito.

El consenso del comité de expertos que participó en esta reunión, reconoce que la nomenclatura para las cepas de *T. cruzi* debe clasificarse en 6 unidades discretas de tipificación o DTUs (del inglés “Discrete Typing Units”): *T. cruzi* I-VI. En nuestro país se ha evidenciado la presencia de los DTUs TcII, TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2009). A partir de este nuevo consenso, los trabajos publicados a posteriori han reconocido y aceptado esta nueva nomenclatura.

d. Ciclo de vida y transmisión de *T. cruzi*

Las poblaciones de *T. cruzi* circulan en la naturaleza entre el hombre, el vector y los reservorios. A lo largo de su ciclo de vida, *T. cruzi* muestra grandes variaciones morfológicas que, de modo general, reflejan su adaptación al hospedero en el que se localizan. Se reconocen tres formas morfológicas fundamentales: tripomastigoto, presente en la sangre de mamíferos e intestino posterior de triatominos, siendo la forma metacíclica no multiplicativa presente en el intestino posterior de los insectos vectores, la infectante para los hospederos mamíferos. Su aspecto es fusiforme, de unos 20 μm de largo, con citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un kinetoplasto subterminal posterior al núcleo, voluminoso, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior; epimastigoto, forma de multiplicación del parásito en el intestino del triatoma, de aspecto fusiforme, de unos 20 μm de largo, muy móviles, con un kinetoplasto localizado por delante del núcleo, o a su nivel, presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre; amastigoto, forma multiplicativa del parásito en el interior de las células del hospedero mamífero, elemento esférico de unos 2 μm de diámetro, en el cual se

distingue el núcleo y el kinetoplasto, aparentemente aflagelado, con un flagelo corto no emergente visible al microscopio electrónico (Brener *et al.*, 2000; MINSAL, 2011).

En condiciones naturales, *T. cruzi* puede infectar alrededor de 150 especies de mamíferos de diferentes órdenes, incluyendo animales silvestres y domésticos (Rassi Jr *et al.*, 2012). La transmisión del parásito se realiza principalmente por medio de los vectores biológicos (transmisión natural), hemípteros hematófagos del Phylum Arthropoda, Subphylum Hexapoda, Orden Hemiptera, Familia Reduviidae y Subfamilia Triatominae, popularmente conocidos como vinchucas (Noireau, 1999; Rassi Jr *et al.*, 2012).

Aunque cerca de 140 especies de triatominos han sido identificadas, solo unas pocas son consideradas vectores competentes para *T. cruzi*. Los principales vectores en países del cono sur son *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis* y *Panstrongylus megistus*; *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países del pacto Andino y en algunos lugares de Centro América y *T. dimidiata* y *Triatoma barberi* en México (Gorla y Noireau, 2010).

La forma clásica de transmisión de *T. cruzi* en áreas endémicas consiste en la transmisión a través de sus vectores naturales, donde influyen factores tales como la pobreza, ruralidad, malas condiciones de la vivienda, temperaturas altas o moderadas y el clima seco. En Chile, se describen dos vectores de la enfermedad: el doméstico, *T. infestans* y el silvestre, *Mepraia spinolai*. Actualmente, se describe un tercer vector biológico, también silvestre, *Mepraia gajardoi*, que habita playas y desiertos costeros de la primera y segunda región (Olea, 1998). *T. infestans* representa la especie de mayor importancia epidemiológica para la ECh por su adaptación al ambiente humano, alimentándose del hombre y sus animales domésticos, manteniendo el ciclo doméstico de la enfermedad. El otro vector, *M. spinolai*, sólo se ha descrito en Chile y habita en zonas silvestres especialmente canteras, guaneras de aves, cuevas de animales y ocasionalmente en corrales y pircas periantrópicas y rara vez en la vivienda humana. Su valor epidemiológico radica en la mantención del ciclo silvestre de la enfermedad (Canals *et al.*, 2000). Aves, reptiles y anfibios son refractarios a *T. cruzi* aunque en algunas situaciones las aves (principalmente gallinas) son importantes fuentes de sangre como alimento para triatominos, los que son estrictamente hematófagos (Rassi Jr *et al.*, 2012).

Otra vía de infección para el hombre es la transmisión sanguínea, cuyo riesgo efectivo de transmisión con 500 mL de sangre infectada es de 10 a 20% (Rassi Jr, *et al.*, 2012) (en Chile no se refieren casos de transmisión por esta vía desde el año 1985). Debido a que los tripomastigotes son separados mayoritariamente en la fracción plaquetaria, el riesgo de transmisión es más alto en transfusiones de plaquetas que de otros componentes sanguíneos. La transmisión congénita también ha sido reportada como otra forma de infección, ocurriendo en al menos el 5% de los embarazos de mujeres crónicamente infectadas en algunas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay, mientras que en otros países endémicos para la ECh varía entre el 1 al 2%. Otras vías de menor significación epidemiológica para la transmisión de ECh, son el trasplante de órganos sólidos o médula ósea desde donantes crónicamente infectados, lo que ha sido bien documentado en Latinoamérica (Rassi Jr, *et al.*, 2012), y raramente infecciones accidentales de laboratorio en personas que trabajan con parásitos vivos (Olea, 1998; Rassi Jr *et al.*, 2012). La ingesta de alimentos contaminados con deyecciones de triatomíneos también se considera como una forma de transmisión (Apt, *et al.* 2008), así también la ingesta de líquidos contaminados con *T. cruzi*. Esta forma de transmisión oral de la enfermedad también es responsable de focos regionales de infección aguda en áreas desprovistas de insectos vectores (Rassi Jr *et al.*, 2012).

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, considerando cada una de las formas evolutivas ya mencionadas. Los triatomíneos se infectan al ingerir sangre de mamíferos que contiene tripomastigotes, acción generalmente indolora y normalmente en la oscuridad, quedando infectados de por vida. En cada picada el insecto adulto puede succionar aproximadamente hasta 0,2 mL de sangre que contiene tripomastigotes. En el intestino medio y posterior de los insectos, los tripomastigotes se diferencian a epimastigotes, los que se multiplican activamente por división binaria. En el intestino posterior, al cabo de 15 a 30 días, se desarrollan los tripomastigotes metacíclicos. Mientras el insecto infectado pica al mamífero, emite deyecciones con tripomastigotas metacíclicos que atraviesan la piel por el sitio de la picadura, las mucosas o bien heridas pre-existentes (Rassi Jr *et al.*, 2012).

Las formas tripomastigotas infectantes penetran las células del hospedero vertebrado para completar su ciclo de vida. Pueden invadir inmediatamente las células reticuloendoteliales y conectivas, o pueden ser transportados en la sangre a otros sitios antes de invadir las células del hospedero. Dentro de estas células, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes, los cuales se multiplican activamente mediante fisión binaria, hasta cumplirse un número pre-programado de divisiones intracelulares para el desarrollo de amastigotes a tripomastigotes y, al cabo de las cuales, la célula hospedera se destruye infectando nuevas células o invadiendo sangre periférica. Las formas tripomastigotes circulantes en la sangre y en la linfa diseminan la infección y el resultado es un incremento exponencial de parásitos intracelulares y sanguíneos. La diseminación es mayoritariamente hacia células musculares (cardíacas, lisas y esqueléticas) (Rassi Jr *et al.*, 2012).

El parasitismo eventualmente decae por la respuesta inmune del hospedero y la parasitemia patente de fase aguda evoluciona gradualmente a una parasitemia subpatente, característica de la fase crónica. El ciclo biológico se completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por los triatomas hematófagos (Brener *et al.*, 2000; Rassi Jr *et al.*, 2012).

T. cruzi ha permanecido en la naturaleza por muchos años. Los reservorios mamíferos (incluido el hombre) domésticos, sinantrópicos y silvestres tienen una importante participación en la mantención e interacción de los ciclos doméstico y silvestre de la ECh. Aunque el hombre es indiscutiblemente el más importante reservorio doméstico, el perro y el gato (en especial el primero, ambos con un promedio de vida de siete años) desempeñan un significativo papel en la dinámica de transmisión del *T. cruzi* en el ámbito humano. El hombre, el perro y la zarigüeya, en sus correspondientes ambientes, son los reservorios conocidos más importantes. El hombre, debido a que su expectativa de vida es superior a los 60 años puede mantener parasitemias detectables por más de 40 años y su sangre, sola o mezclada con la de otros vertebrados, constituye la fuente de alimentación del 50,5% al 91% de los triatomos domiciliarios (Schenone *et al.*, 2000), situación que en Chile ha cambiado en la última década, gracias al control certificado del vector domiciliario, *T. infestans*.

e. Aspectos clínicos

En la ECh se pueden distinguir dos fases: aguda y crónica (Rassi Jr *et al.*, 2012). La mayoría de las personas infectadas ignora que han adquirido la parasitosis, debido a que en el período agudo los síntomas son infrecuentes y cuando existen corresponden a fiebre, inflamación de ganglios linfáticos, ocasionalmente reacción inflamatoria alrededor de la zona de la picadura, edema ocular y de manera más rara, miocarditis severa o meningoencefalitis. Estos síntomas persisten durante semanas o meses y las formas tripomastigotes del parásito pueden ser observadas en la circulación periférica. El período crónico puede ser dividido en inicial indeterminado y tardío determinado, y está limitado por la parasitemia subpatente y una miocardiopatía dilatada, compromiso del sistema digestivo o del sistema nervioso central. Se estima que un 27% de los pacientes presentará daño cardíaco, constituyendo la principal causa de muerte cardiovascular en áreas endémicas del continente americano (Rassi Jr *et al.*, 2006); 6% desarrollará megavisceras y un 3% daño neurológico.

En personas con depresión del sistema inmunológico como consecuencia de SIDA o quimioterapia, la ECh puede reactivarse con una gran cantidad de parásitos en la sangre periférica y otros tejidos del cuerpo (Tarleton, 2007).

El 63% de las personas infectadas no desarrollarán síntomas clínicos. Por el contrario, en pacientes crónicos que cursan el período tardío final de la ECh con *Core Bovis* o insuficiencia cardíaca, el cuadro es irreversible y generalmente requiere tratamiento quirúrgico para mejorar su calidad de vida. En Chile, aproximadamente el 30% de los pacientes con ECh tienen cardiopatías y de ellos un tercio necesita marcapasos para sobrevivir (Apt *et al.*, 2005).

f. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Diagnóstico serológico

En el curso de la infección por *T. cruzi*, los primeros anticuerpos detectados pertenecen a la clase IgM, siendo remplazados gradualmente por IgG a medida que progresa la infección (Noireau, 1999). En Chile, el diagnóstico serológico se realiza rutinariamente mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Zulantay *et al.*, 1998). La sensibilidad de estas técnicas depende de la fase de la enfermedad y del tipo de inmunoglobulina estudiada. De este modo, en la fase crónica, la pesquisa de IgG alcanza una sensibilidad entre 95-100%, no así en la fase aguda en que IgM presenta una mayor sensibilidad y especificidad. La OMS recomienda efectuar al menos dos técnicas serológicas convencionales para confirmar la infección (Noireau, 1999; Brener *et al.*, 2000).

Es importante señalar que si bien las técnicas de serología convencional presentan una buena sensibilidad, no permiten determinar la etapa de la infección ni la evolución clínica, así como tampoco permiten realizar estudios de evaluación de eficacia quimioterapéutica debido a que permanecen persistentemente positivas en el tiempo, aun cuando las pruebas parasitológicas resulten negativas (Cañado, 1999).

Diagnóstico parasitológico

El diagnóstico parasitológico de la ECh está basado en la demostración de la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en el período agudo de la infección. Los métodos de elección son: examen microscópico de sangre fresca, Strout, microhematocrito, hemocultivo y xenodiagnóstico (XD) (Apt *et al.*, 2005). En el período crónico de la enfermedad, la parasitemia disminuye a niveles subpatentes y la utilidad de las pruebas directas se ve limitada, siendo en esta etapa los métodos de elección aquellos que detectan anticuerpos específicos contra el parásito. Es así como en Chile, el estudio parasitológico de la infección chagásica en esta etapa de la infección, se ha efectuado principalmente a través de XD.

El XD es un procedimiento sofisticado desarrollado por Brumpt (1914) que utiliza el vector obtenido de cultivo biológico para la detección de la infección de *T. cruzi* en el hombre y otros mamíferos. En el XD, se utilizan ninfas de triatomíneos libres de infección obtenidas de colonias de laboratorio alimentadas sobre gallinas, refractarias al parásito. El XD, constituido por una cajita cilíndrica de madera o material similar que lo reemplace, cubierto por una pieza de gasa, contiene 7 a 10 ninfas de tercer o cuarto estadio, soportado por un brazaletes, y es aplicado, durante 20 a 30 minutos, sobre la superficie de la piel de los miembros superiores de los individuos a examinar. Transcurrido este tiempo, las ninfas son incubadas a 27°C y 80% de humedad. Luego de 30 días, las deyecciones (heces y orina) de los insectos son examinadas microscópicamente en busca de formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi* (Schenone, 1999).

El estudio parasitológico de la infección chagásica en nuestro país, se ha efectuado principalmente a través de XD, debido a la carencia de otros métodos más eficaces para aislar *T. cruzi* desde la sangre de individuos infectados (Schenone *et al.*, 1995a). 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% (Schenone *et al.*, 1995b; Solari *et al.*, 1998). En la infección crónica, en cambio, se ha reportado una sensibilidad de 49,3% (Schenone *et al.*, 1974). Su rendimiento aumenta significativamente a medida que aumenta el número de cajas utilizadas (Schenone *et al.*, 1991). Una desventaja del XD, es el período que transcurre para obtener un resultado, el que varía entre 30 y 120 días (WHO, 1991; Noireau, 1999).

En Chile, el XD ha demostrado una positividad de 80,3% y 86,4% en la infección congénita y aguda respectivamente, mientras que en el período crónico, el XD constituye la herramienta de elección para el diagnóstico parasitológico, con un rendimiento máximo de un 70% al aplicar seis cajas (dos diarias) con 7 ninfas de *T. infestans* (Schenone, 1999). Estudios recientes en individuos con ECh crónica no tratados, revelan una sensibilidad del XD de 14% aplicando 14 ninfas de *T. infestans* (Zulantay *et al.*, 2011).

El XD es considerado una buena herramienta parasitológica en el diagnóstico etiológico de la ECh, tanto para la selección de pacientes previo a terapias etiológicas, como para evaluación de eficacia quimioterapéutica (Apt *et al.*, 2005).

Diagnóstico parasitológico molecular: Reacción de la polimerasa en cadena

En la última década, la técnica de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) ha sido introducida como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la ECh, permitiendo no solamente reconocer la presencia de *T. cruzi* en sangre, casos congénitos o evaluación de la eficiencia quimioterapéutica, sino también caracterizar las cepas circulantes de *T. cruzi* en vectores y mamíferos (Breniere *et al.*, 1995, Schijman *et al.*, 2003). Su sensibilidad es cercana al equivalente de 0,25 parásitos/mL de sangre (Schijman *et al.*, 2003).

La PCR es un método enzimático de síntesis de múltiples copias de un segmento específico de ADN. Se asemeja al proceso natural de replicación de ADN donde el número de moléculas se duplica después de la repetición de tres pasos sucesivos que forman un ciclo bajo condiciones de temperaturas controladas:

-Desnaturación: La molécula de ADN de doble cadena usada como molde, es denaturada por incubación a alta temperatura. Las hebras disociadas permanecen libres en solución hasta que la temperatura descienda lo suficiente como para permitir la alineación de los oligonucleótidos usados como partidores.

-Alineamiento de partidores de extensión: Los partidores o primers de extensión son definidos como el par de oligonucleótidos sintéticos que se alinean a sitios vecinos a la región a ser amplificada. Cada partidor se alinea solo a una de las hebras de ADN, ya que poseen secuencias diferentes que no los hacen complementarios el uno del otro.

-Extensión de los partidores: Es la extensión del complejo partidor-hebra de ADN mediante la enzima ADN polimerasa. Esta extiende los partidores en su extremo 3'. Puesto que los extremos 3' de los partidores se enfrentan, ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento llevan a una síntesis exponencial de copias del segmento específico comprendido entre los extremos 5' de los partidores, conocido también como "producto corto". El empleo de una enzima termoestable, purificada desde *Thermus aquaticus* simplifica el procedimiento al no requerir la adición de enzima fresca después de cada paso de desnaturación (Oste, 1988). La calidad del ADN constituye un elemento crucial para esta técnica, la cual necesita un método

de extracción lo más estandarizado posible con el que se obtenga un ADN puro, no degradado, libre de ARN y de inhibidores de la PCR.

La técnica de PCR ha permitido optimizar el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* amplificando ADN desde regiones altamente repetidas del genoma de este protozoo, constituyéndose en una promisorio herramienta para ser utilizada en el diagnóstico de la infección. El ADN nuclear y kinetoplastídico de *T. cruzi* contiene varias secuencias repetitivas que son de mucha utilidad como blanco para la técnica de PCR, abundantes y fáciles de purificar desde la célula tripanosómica (Junqueira *et al.*, 1996). Un fragmento de aproximadamente 330 pb de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi* es normalmente usado para la amplificación con los primers 121 y 122. Por otra parte, el satélite repetido de ADN nuclear de 195 pb de *T. cruzi*, es el blanco para los primers Tcz1/Tcz2 y Diaz1/Diaz2, los cuales no amplifican ADN de otros parásitos del género Trypanosoma o Leishmania (Virreira *et al.*, 2003).

El diagnóstico de la ECh realizado a través de PCR en muestras de sangre de individuos infectados, ha demostrado poseer mayor sensibilidad en relación al XD y hemocultivo (Solari *et al.*, 2001). Es así como en Chile, en un estudio realizado en 67 niños menores de 10 años con infección chagásica determinada por serología convencional, PCR evidenció una sensibilidad del 97%, mientras que en 79 individuos donantes de sangre serológicamente positivos para *T. cruzi* procedentes de la Región Metropolitana, la sensibilidad para PCR fue del 69,3% (Soto, 1998). Otros estudios realizados en pacientes crónicos en distintas áreas geográficas del Brasil y en los que se emplearon diferentes volúmenes de muestra, revelaron porcentajes de sensibilidad que oscilan entre el 59.4% y el 100% (Junqueira *et al.*, 1996). Es decir, existirían variaciones de los niveles de parasitemia detectados por PCR que dependerían de la fase de la infección, edad del paciente, volúmenes de muestras empleados y área geográfica de los individuos analizados.

Se ha descrito además, la aplicación de PCR en deyecciones y hemolinfa de triatomos recogidos sobre papel filtro, demostrándose alta sensibilidad (Machado *et al.*, 2000). Por otra parte, Dorn y col. (2001), reportan la aplicación de PCR en muestras de tejido fresco de triatomos (recto más intestino), en comparación con PCR aplicado en deyecciones

de los mismos triatomíneos, obteniendo porcentajes comparables de sensibilidad. También se ha aplicado la PCR en muestras de deyecciones de XD (PCR-XD), la cual se ha convertido en una herramienta eficiente para el diagnóstico y evaluación de la eficacia quimioterapéutica de la ECh, pero tiene el inconveniente que sólo está disponible en centros de investigación (Zulantay *et al.* 2007). Se ha comprobado una sensibilidad superior y un resultado más precoz del PCR-XD frente al XD en la detección de *T. cruzi* (Zulantay *et al.*, 2011). La alta especificidad y sensibilidad demostrada por la técnica de PCR, ha permitido plantear nuevas hipótesis, que han permitido ampliar el conocimiento acerca de la compleja relación hospedero-parásito en la ECh crónica.

g. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

La ECh debe ser tratada siempre, independiente del periodo o fase de ésta, con excepción de aquellos pacientes con ECh cardiopatas con *Core bovis* o insuficiencia cardiaca, estando contraindicado además en embarazadas, mujeres en periodo de lactancia, pacientes con alcoholismo crónico inveterado y en personas con hepatopatías, nefropatías y hemopatías graves. Los únicos fármacos que por razones éticas y de eficacia se utilizan en la ECh humana son NFX y BNZ, ambos utilizados desde la década de 1970-1980 (Apt y Zulantay 2011). NFX y BNZ son dos agentes nitroheterocíclicos efectivos, los cuales actúan sobre el genoma de *T. cruzi*, inhibiendo la síntesis de ADN, ARN y de proteínas, degradando estas moléculas, reduciendo la parasitemia (Apt, 1999) y demostrando sensibilidad selectiva sobre las diferentes cepas de *T. cruzi*. NFX actúa por reducción del grupo nitro o radicales aniónicos inestables los que producen una reacción con resultado de generación de metabolitos oxirreducidos, como el anión superóxido y peróxido de hidrógeno. *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación para los metabolitos de oxígeno, especialmente peróxido de hidrógeno, haciéndolo sensible al estrés oxidativo.

Aunque éstos son los únicos fármacos autorizados internacionalmente para el tratamiento de la ECh, originan efectos colaterales y su eficacia es variable (Apt, 1999). Las reacciones adversas reconocidas son: alteraciones generales y digestivas (baja de peso, malestar gástrico, náuseas y vómitos); hematológicas (leucopenia, trombocitopenia, agranulocitosis); dermatológicas (eritema, rash sensible a la luz, dermatitis atópica leve o

severa y ocasionalmente síndrome de Stevens Johnson) y neurológicas (polineuropatías dosis dependiente en altas dosis y en un 10-30% de los pacientes con las dosis habituales) (Apt *et al.* 2011; Valencia *et al.*, 2012). En la actualidad, no existe tratamiento etiológico eficaz sin efectos colaterales y de fácil adquisición. Se ha estimado que el porcentaje de curación en tratamiento de la ECh durante el periodo crónico alcanza el 30%. Pese a esto, es de suma importancia tratar a los pacientes con ECh crónica que cursan el periodo indeterminado, puesto que al hacerlo, se evita el desarrollo de cardiopatía, que es evolutiva y por lo general de mal pronóstico (Apt y Zulantay, 2011).

2. PCR en Tiempo Real y su aplicación en la enfermedad de Chagas crónica

a. Generalidades

La técnica de PCR convencional ha mejorado notablemente la eficiencia diagnóstica en la detección de *T. cruzi* circulante en sangre humana (Burgos *et al.*, 2009). Sin embargo, el ADN amplificado no tiene relación con la concentración inicial presente en la muestra, debido a que PCR 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 el mismo sitio de reacción. Ambas estrategias, PCR y qPCR, han sido exitosamente aplicadas en la evaluación de tratamiento en casos pediátricos tratados con BNZ (Schijman *et al.*, 2003; Duffy *et al.*, 2009). No obstante, la técnica de qPCR, comparada con PCR convencional, permite evaluar un mayor número de muestras en forma simple, precisa y en un rango mayor que los procedimientos convencionales (Costa, 2004). Debido a que la serología no es útil en la evaluación de eficacia de tratamiento ya que permanece positiva durante muchos años posterior a un tratamiento eficaz (Piron *et al.*, 2007), la qPCR aparece como una herramienta promisoriosa para la evaluación del tratamiento tripanocida (Duffy *et al.*, 2009).

La qPCR está basada en la reacción en cadena de la polimerasa y se usa para amplificar y al mismo tiempo cuantificar moléculas de ADN o ADN complementario (Heid *et al.*, 1996). Una de las ventajas más importantes de la qPCR es que el proceso completo se realiza en el termociclador. Esta característica ayuda a disminuir el riesgo de posterior contaminación en el laboratorio por productos amplificados y por tanto de falsos positivos, permitiendo aumentar el rendimiento de la prueba en tiempo real (Valasek y Repa, 2005). El sistema incluye dos componentes: elementos ópticos integrados al termociclador y marcadores fluorescentes que proporcionan información acerca de la amplificación a lo largo de los ciclos de PCR (Heid *et al.*, 1996). Mediante detección de fluorescencia, es posible medir la cantidad de ADN sintetizado en cada momento desde que la emisión de fluorescencia se produce en la reacción,

ya que ésta es proporcional a la cantidad de ADN formado. Existen dos sistemas de detección de marcadores fluorescentes para la qPCR: genéricos y específicos.

b. Detección genérica: SYBR® Green

La detección genérica se basa en la utilización de fluoróforos que se unen e intercalan a todas las secuencias de ADN doble hebra en una reacción de qPCR. Una vez que el fluoróforo se une al ácido nucleico formado en la reacción, éste emite una señal fluorescente que es procesada en tiempo real (Walker, 2002). Por tanto, un aumento del producto de qPCR conduce a un aumento de la fluorescencia detectada en cada ciclo de reacción, permitiendo que las concentraciones de ADN puedan ser cuantificadas (Ririe *et al.*, 1997). Se han descrito varios marcadores genéricos, pero el más utilizado es el fluoróforo SYBR® Green. Estos marcadores no sólo son más económicos, sino que también son distribuidos por los proveedores de reactivos como mezclas listas para su uso y no requieren un diseño experimental adicional (Ririe *et al.*, 1997; Giglio *et al.*, 2003). La principal limitación de estos marcadores es que al unirse a los ácidos nucleicos totales en la reacción de qPCR, emiten una señal luminosa tanto para productos específicos como para aquellos que no lo son (ejemplo, dímeros de primers). Para hacer frente a esta situación se debe realizar análisis de los resultados en la curva de fusión (también conocida como curva de melting o “dissociation curve”). Este análisis permite que los productos no específicos puedan ser discriminados de los amplicones específicos (Ririe *et al.*, 1997), al comparar la temperatura de melting (T_m) de los productos de qPCR generados durante la reacción.

c. Detección específica: Sondas TaqMan®

En contraste, las técnicas que usan marcadores fluorescentes específicos emplean oligonucleótidos marcados con un fluoróforo que se unen a segmentos específicos del ADN blanco. Los métodos que utilizan sondas fluorescentes tienen la ventaja de ser muy precisos y evitar posibles artefactos o secuencias inespecíficas presentes en el producto de la PCR, por lo que la interpretación de los resultados suele ser más rápida y directa. Uno de los métodos más utilizados para realizar detección específica se basa en el uso de sondas TaqMan®. Es importante mencionar que la mayoría de estas sondas usan el fenómeno FRET (fluorescent

resonance energy transfer) para emitir las señales luminosas que se van a medir en el termociclador a medida que se obtenga el producto de qPCR. La sonda corresponde a un oligonucleótido corto de ADN, complementario a una de las hebras de ADN blanco. Éste oligonucleótido está conjugado por el extremo 5' con un fluoróforo, conocido como reportero, y por el extremo 3' conjugado con un "quencher". Cuando ambos se encuentran cercanos, esto es, ambos se encuentran unidos a la sonda ya que ésta se encuentra intacta, el quencher absorbe la energía de fluorescencia emitida desde el reportero (Heid *et al.*, 1996), por lo cual no hay generación de señal fluorescente. Durante la fase de extensión de la qPCR, la sonda es degradada por la ADN polimerasa mediante su actividad 5'-3' exonucleasa, generando la separación entre el reportero y el quencher, permitiendo que el primero pueda emitir sin restricción su fluorescencia. De este modo, la degradación de la sonda resulta en un incremento de la señal del reportero que es correspondiente con la amplificación específica del ADN blanco (Valasek y Repa, 2005; Walker, 2002; Heid *et al.*, 1996).

d. qPCR aplicado al estudio de la enfermedad de Chagas

Una propiedad inherente a la PCR y que se utiliza en la qPCR, es el hecho que mientras más copias de ADN existan en la muestra blanco inicial, menos ciclos de amplificación del templado son necesarios para obtener un número determinado de producto. Por tanto, el número de ciclos de amplificación asociado a un determinado nivel de fluorescencia (valor Ct) necesarios para alcanzar el umbral de detección de fluorescencia fijado (threshold level) es inversamente proporcional a la cantidad de ADN que existe en la muestra original (Walker, 2002) (es decir, a mayor cantidad de ADN blanco inicial, menos ciclos de amplificación, y viceversa). Esto es válido tanto para la detección genérica como para la específica. De este modo, conociendo el valor Ct de una muestra positiva a *T. cruzi* amplificada paralelamente a una curva estándar para qPCR, construida a partir de concentraciones conocidas de *T. cruzi*, es posible determinar la concentración de ADN inicial de dicha muestra y por consiguiente, cuantificar la parasitemia en la muestra de un paciente con ECh. Esto último sin duda constituye una atractiva alternativa para la evaluación del éxito del tratamiento antichagásico. En el presente estudio, se evalúa la eficacia de NFX en pacientes que cursan la etapa crónica de la ECh.

III. HIPÓTESIS

La cuantificación de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR Tiempo Real permite evaluar la eficacia quimioterapéutica en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.

IV. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al establecimiento de nuevos parámetros de evaluación de eficacia quimioterapéutica de la enfermedad de Chagas crónica, a través de la cuantificación mediante PCR Tiempo Real de los niveles circulantes de *Trypanosoma cruzi*, en individuos tratados con Nifurtimox.

V. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estandarizar la técnica de PCR Tiempo Real en muestras de sangre periférica para la cuantificación de *Trypanosoma cruzi* circulante en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.
- Evaluar la condición parasitológica mediante PCR Tiempo Real, en pacientes con enfermedad de Chagas crónica en condiciones pre y post-terapia con Nifurtimox.
- Comparar la condición parasitológica de pacientes con enfermedad de Chagas crónica determinada mediante PCR Tiempo Real en sangre periférica y herramientas parasitológicas convencionales como PCR en muestras de sangre (PCR-S) y PCR en muestras de deyecciones de xenodiagnóstico (PCR-XD), respecto a xenodiagnóstico (XD).
- Evaluar la eficacia de Nifurtimox en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Población en estudio

Estuvo constituida por individuos con ECh crónica, condición confirmada mediante las técnicas de serología convencional ELISA e IFI-IgG (Zulantay *et al.*, 1998) procedentes de localidades urbanas o rurales de las Provincias de Choapa (Comunas de Illapel, Salamanca, Los Vilos y Canela) y Limarí (Combarbalá), zonas endémicas para la ECh en la IV Región de Coquimbo, Chile. Todos los pacientes aceptaron formar parte del estudio mediante Consentimiento Informado (Proyecto Fondecyt 1100768) aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Resolución 049-2009).

2. Selección de la muestra de estudio

De los individuos controlados por ECh crónica en el periodo 2007-2011, en el marco del estudio de tratamiento con NFX, se seleccionaron de un universo de 100 individuos tratados, 44 individuos que cumplieran con el criterio de inclusión de tener resultados de XD positivo o negativo previo al tratamiento con NFX, además de tener disponible muestras biológicas de al menos un control posterior al tratamiento. De esta forma, se conformaron dos grupos de estudio: el primero conformado por 22 individuos con XD (+) y el segundo, por 22 individuos con XD (-). Cada grupo estuvo constituido por 18 individuos de sexo femenino y 4 de sexo masculino, con edades que fluctuaban entre 23 y 72 años para el grupo XD (+) y entre 22 y 58 años para el grupo XD (-). Debido a los diversos efectos adversos asociados a NFX y por razones éticas, no se conformó un grupo control el cual consistiera en individuos sin ECh a los que se les administrara NFX. Por otra parte, la administración de un placebo a pacientes con ECh es cuestionable, dado que todos ellos deben recibir tratamiento dirigido al parásito.

Para la estandarización de la reacción de qPCR, se seleccionó un total de 50 muestras, 25 de ellas correspondientes a individuos con ECh y las restantes pertenecientes a individuos no infectados por *T. cruzi*, condición determinada mediante serología (IFI y/o ELISA), XD, PCR-XD y PCR-S.

3. Tratamiento con Nifurtimox

El esquema terapéutico de NFX aplicado a cada paciente fue el recomendado en la Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas vigente (MINSAL, 2011) que corresponde a 8 mg/kg/día durante 60 a 90 días. De preferencia, NFX se administró cada 8 horas, después de una ingesta de alimentos. La administración se inició en forma escalonada iniciando un cuarto de la dosis el primer día, la mitad de la dosis los días 2 y 3 y la dosis total al día 4, contándose los 60 días de tratamiento desde el momento en que inició la dosis total. La administración y control de eventuales efectos adversos estuvo a cargo de médicos de zona de las localidades mencionadas con anterioridad, supervisados por el médico parasitólogo especialista del proyecto, Dr. Werner Apt Baruch (Valencia *et al.*, 2012).

El periodo de seguimiento para el grupo XD (+) varió entre 1-18 meses post-terapia con NFX, mientras que el periodo de seguimiento del grupo XD (-) varió entre 1-17 meses.

4. Técnicas parasitológicas

Todos los pacientes fueron evaluados en condiciones pre y post-terapia mediante las técnicas parasitológicas de XD, PCR-XD, PCR-S y qPCR en sangre, según lo descrito a continuación.

4.1. Xenodiagnóstico

A todos los individuos con ECh crónica se aplicó XD según técnica descrita por Schenone (1999), consistente en dos cajas, cada una con 7 ninfas de tercer o cuarto estadio de *T. infestans* libres de infección, aplicadas en la cara externa de cada brazo durante 20 a 30 minutos. Luego de su aplicación, las cajas fueron mantenidas a 27 °C y 80% de humedad, para posteriormente realizar un examen microscópico de la deyección de cada insecto a los 30, 60 y 90 días de incubación, en búsqueda de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*. La presencia de un parásito por campo se consideró un resultado positivo.

4.2. PCR convencional en muestras de deyecciones y sangre periférica

4.2.1. Muestras de deyecciones de triatomino de xenodiagnóstico para PCR

Paralelamente a la observación microscópica, se preparó un pool con las deyecciones de las 14 vinchucas contenidas en las dos cajas de XD, para cada período de incubación. La deyección de los insectos fue recibida en 500 μ L de buffer PBS 7,2, incubado por 15 minutos a 98°C y centrifugado por 3 minutos a 3.500 rpm. Sobrenadantes de 200 μ L fueron almacenados a -20°C hasta la extracción y purificación de ADN (Zulantay *et al.*, 2007).

4.2.2. Muestras de sangre periférica de individuos con y sin enfermedad de Chagas crónica

Se realizó punción venosa a todos los individuos con ECh en condiciones de pre y post-terapia para obtener 5 mL de sangre periférica, 2 de los cuales fueron recibidos en 2 mL de Guanidina-EDTA (volumen 1:1). Todas las muestras fueron incubadas durante 15 minutos a 98°C para deconcatenar la red de minicírculos de *T. cruzi*. Posterior a ello, la mezcla fue mantenida a 4°C hasta la extracción de ADN. Los 3 mL restantes fueron utilizados en serología convencional (IFI y/o ELISA). El mismo procedimiento se llevó a cabo en los individuos sin ECh, cuyas muestras biológicas se utilizaron en la estandarización de qPCR.

4.2.3. Purificación de ADN presente en las muestras de deyecciones de XD y sangre venosa

El proceso de purificación del sobrenadante obtenido del pool de deyecciones de vinchucas utilizadas en el XD, se realizó a través del kit FavorPrep Blood Genomic DNA Extraction Mini Kit (Favorgen), a partir de un volumen de muestra de 50 μ L y omitiendo el paso de lisis celular descrito en el protocolo original del kit. La purificación se realizó utilizando los reactivos según especificaciones del kit. Por otra parte, la purificación de ADN presente en las muestras de sangre venosa se realizó a partir de un volumen de 200 μ L, utilizando el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), modificado para mejorar la extracción de ADN. El protocolo se realizó según se describe:

-Lisis celular: en un tubo Eppendorf se agregó 20 µL de QIAGEN Proteinasa K y se adicionó 200 µL de la muestra sanguínea y 200 µL de buffer de lisis. Se homogenizó la mezcla mediante vórtex durante 15 segundos, se incubó a 56°C por 10 minutos para producir lisis y finalmente se centrifugó brevemente el tubo para remover los residuos de paredes y tapa.

-Unión: se adicionó 200 µL de etanol (96-100%) a la muestra y se homogenizó mediante vórtex. Se centrifugó brevemente el tubo para remover los residuos de paredes y tapa y luego, en un nuevo tubo de recolección, se colocó una columna QIAamp Mini spin y se transfirió cuidadosamente la muestra. Se centrifugó durante 1 minuto a 8.000 rpm y luego se descartó el filtrado generado.

-Lavado: se lavó la columna QIAamp Mini spin con 500 µL de Buffer AW1 mediante centrifugación por 1 minuto a 8.000 rpm y luego se descartó el filtrado generado. Se realizó un nuevo lavado de la columna con 500 µL de Buffer AW2 mediante centrifugación por 3 minutos a 14.000 rpm, descartando el filtrado. Finalmente se volvió a centrifugar por 3 minutos adicionales para secar la columna, evitando que el líquido residual inhibiera las subsiguientes reacciones enzimáticas.

-Elución: se colocó la columna QIAamp Mini spin en un tubo Eppendorf nuevo. Considerando una modificación al protocolo convencional, se adicionó 100 µL de buffer de elución, previamente incubado a 56°C durante 10 a 15 minutos, al centro de la membrana QIAamp Mini spin y se centrifugó a 8.000 rpm por 1 minuto para obtener la elución que contiene los fragmentos de ADN. Se agregó nuevamente 100 µL de buffer de elución y se sometió a centrifugado por 1 minuto a 8.000 rpm para obtener el ADN remanente. Luego de la extracción, el eluido de 200 µL fue mantenido a -20°C hasta su amplificación, protegiéndolas con un film de parafina plástico (Parafilm) para evitar su posible evaporación o contaminación.

4.2.4. Reacción de PCR con partidores ADNk-*T. cruzi*.

La mezcla de reacción estuvo compuesta por 5 µL de los purificados de XD o sangre de los pacientes, procesados con los métodos mencionados anteriormente, 1 µL de cada uno de los oligonucleótidos kinetoplastídicos 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') y 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3') a concentración 0,5 µM; del Sistema Gotaq® Flexi DNA Polimerase (Promega) se utilizó 4 µL de buffer Taq polimerasa 10x con buffer de carga incorporado; 2 µL de MgCl₂ (25 mM); 0,4 µL (1 mM) de los cuatro dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); 0,2 µL de Taq polimerasa (5 U) y 6,4 µL de agua estéril libre de nucleasas para un volumen final de 20 µL (Zulantay *et al.*, 2011).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador TC-412 (Techne) y consideró 2 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; y un ciclo final de extensión de 72°C por 10 minutos. Posteriormente, 10 µL del amplificado se sometieron a electroforesis por aproximadamente 60 minutos, a 113 volts en gel de agarosa 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 *T. cruzi*, cepa Tulahuén. Como control negativo, se utilizó una mezcla de reacción sin ADN y en todos los geles fue incluido un marcador de 100 pb (Blench Top 100bp DNA Ladder). Finalmente se tomó una fotografía de registro de cada uno de los geles obtenidos (Zulantay *et al.*, 2011).

4.3. PCR Tiempo Real de muestras de sangre periférica mediante sistema TaqMan®

Para determinar la carga parasitaria mediante qPCR en individuos con ECh tratada con NFX, fue necesario establecer previamente las condiciones de estandarización de la reacción de qPCR mediante el sistema de detección TaqMan®, proceso que consideró las siguientes etapas:

4.3.1. Obtención de ADN de *T. cruzi*

Con el fin obtener ADN parasitario y realizar diluciones seriadas de éste para la generación de la curva estándar, necesaria para realizar cuantificación mediante qPCR, se utilizó un stock de formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa Tulahuén (clasificación DTU TcVI) obtenidas de cultivo axénico en medio Diamond en fase exponencial. Los parásitos fueron gentilmente aportados por el Dr. Juan Diego Maya, del Programa de Farmacología del ICBM, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El cultivo con parásitos fue centrifugado por 4 minutos a 3.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y luego se agregó 200 µL de una solución de formalina tamponada al 5% (buffer fosfato salino (PBS) más formalina) para matar las formas epimastigotas de *T. cruzi*. Se centrifugó y lavó 3 veces con PBS. Con el fin de estimar la concentración de parásitos/mL presente en el cultivo, se realizó conteo de los parásitos en cámara de Neubauer mediante el siguiente protocolo:

Se tomó una alícuota de 10 µL de la suspensión de parásitos en PBS, previamente homogeneizados mediante vórtex y se cargaron en la cuadrilla superior y/o inferior de la cámara de Neubauer. Inicialmente, se evaluó la viabilidad de los parásitos y concentración apropiada para realizar el conteo mediante microscopio óptico con aumento de 10x. Si la concentración parasitaria resultara demasiado alta, y por tanto, dificulta el conteo parasitario, se debe considerar la realización de una dilución 1:10 de los parásitos con buffer pH 7,2. El conteo se realizó en las 4 áreas correspondientes a las esquinas de la cámara de Neubauer. Una vez sumado el número de parásitos, se aplicó la siguiente fórmula, para estimar la cantidad de parásitos/mL:

$$\text{FÓRMULA } \boxed{\text{Parásitos/mL} = 10.000 \times (\text{Parásitos contados}/4)}$$

Aplicado este cálculo, se determinó que la concentración parasitaria mediante este método de cuantificación correspondió a $8,9 \times 10^6$ parásitos/mL. Luego, se procedió a depositar 1 mL en un tubo Eppendorf, el cual fue centrifugado y el sobrenadante fue eliminado, obteniéndose un pellet concentrado de formas epimastigotas de *T. cruzi* equivalente a $8,9 \times 10^6$ parásitos. A este pellet se agregó 200 µL de buffer PBS y luego fue conservado a -20°C hasta el proceso de extracción y purificación del ADN parasitario.

4.3.2. Purificación de ADN de *T. cruzi*.

El proceso de extracción y purificación se realizó en forma similar a lo descrito para las muestras de sangre obtenidas desde los pacientes con ECh, es decir, utilizando el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), eluyendo esta vez en un volumen final de 100 μ L a fin de concentrar el ADN parasitario purificado, el que fue mantenido a -20°C hasta su posterior cuantificación, protegiéndolo con un film de parafina plástico (Parafilm) para evitar evaporación o contaminación.

4.3.3. Cuantificación de ADN de *T. cruzi*

Se realizó cuantificación de ADN parasitario purificado total para establecer la cantidad de ADN equivalente al punto más alto establecido para la curva estándar (1×10^6 parásitos) y a partir de esta información, desarrollar la curva estándar de *T. cruzi* necesaria para qPCR. Se utilizó el kit de cuantificación AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit (Biotium) en el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene (Agilent Technologies). Este kit contiene un fluoróforo de unión a ADN de doble hebra, lo cual permite la detección y cuantificación del ADN total de una muestra al hacer una lectura de fluorescencia final en un equipo de qPCR, interpolando la muestra en una curva estándar de ADN incluida en el kit. La solución maestra de AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Solution y AccuBlue™ (100X) High Sensitivity Enhancer se preparó protegiéndola de la luz en proporción 100:1 respectivamente, considerando en los cálculos respectivos la curva incluida en el kit y el ADN parasitario a evaluar en triplicado. Luego se agregó 40 μ L de la solución maestra preparada a cada uno de los tubos de reacción y se adicionó 2 μ L de purificado de ADN parasitario o de cada uno de los ocho estándares de ADN incorporados en el kit (0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8 y 10 ng/ μ L dsDNA Standards). Se homogeneizó el contenido del tubo de reacción mediante vortex, y se llevó al equipo de qPCR protegiéndolas de la luz. Se incubó la placa en oscuridad al interior del equipo durante 5 minutos a 25°C . Transcurrido este tiempo, se realizó una lectura final de fluorescencia con el filtro FAM del termociclador, obteniéndose la cantidad de ADN presente en la muestra de parásitos expresada en ng/ μ L (Bravo *et al.*, 2012).

El ADN cuantificado y determinado equivalente a 1×10^6 epimastigotes por mL fue diluido en orden de 10, obteniéndose distintas concentraciones equivalentes a una determinada cantidad de parásitos por mL (Tabla 1). Todos los cálculos se han estimado considerando que *T. cruzi* posee 200 fg de material genético (Kooy *et al.*, 1989; Ferrer *et al.*, 2008; Duffy *et al.*, 2009).

Tabla 1: Equivalencias en distintas unidades de masa de ADN de *T. cruzi* para una determinada concentración de parásitos.

Concentración <i>T. cruzi</i>	Número de parásitos	ADN de <i>T. cruzi</i> en femtogramos (fg)	ADN de <i>T. cruzi</i> en nanogramos (ng)
1×10^6	1.000.000	200.000.000 fg	200 ng
1×10^5	100.000	20.000.000 fg	20 ng
1×10^4	10.000	2.000.000 fg	2 ng
1×10^3	1.000	200.000 fg	0,2 ng
1×10^2	100	20.000 fg	0,02 ng
1×10^1	10	2.000 fg	0,002 ng
1×10^0	1	200 fg	0,0002 ng
1×10^{-1}	0.1	20 fg	0,00002 ng
1×10^{-2}	0.01	2 fg	0,000002 ng
1×10^{-3}	0.001	0.2 fg	0,0000002 ng

4.3.4. Cuantificación de ADN humano

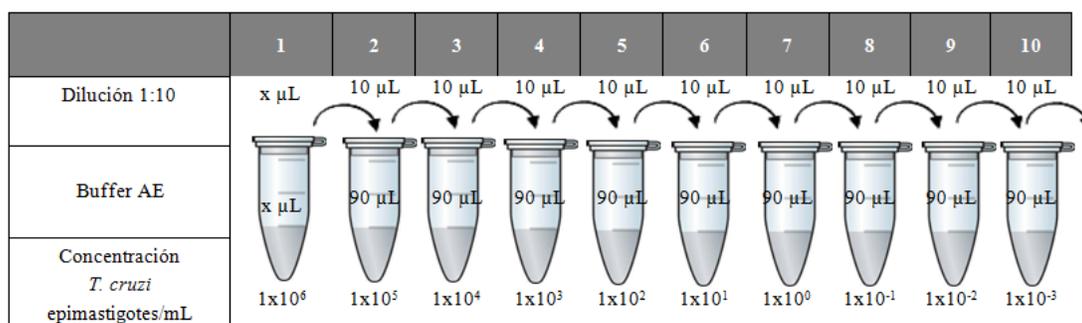
Siguiendo la misma metodología, se procedió a determinar la cantidad de ADN presente en un pool de purificado de sangre humana generado a partir de muestras provenientes de 4 individuos sin ECh y clínicamente sanos. Con el resultado de esta determinación se procedió a generar en forma simultánea, una curva estándar de ADN humano para qPCR, cuantificada con la misma metodología descrita para ADN de *T. cruzi*.

4.3.5. Curva estándar de ADN de *T. cruzi* y ADN humano

Se dispuso un tubo Eppendorf estéril, al cual se agregó, la cantidad de μL de ADN equivalente a 1×10^6 formas epimastigotas de *T. cruzi* por mL, según los resultados obtenidos en la cuantificación de ADN total parasitario, disueltos en buffer de elución, hasta completar un volumen de 100 μL . Dado que el volumen final del primer estándar es 100 μL y por tanto corresponde a la décima parte de 1 mL, se agregó solo el ADN equivalente a 1×10^5 formas epimastigotas de *T. cruzi* y se completó con buffer de elución hasta los 100 μL . El estándar

generado es equivalente a 1×10^6 parásitos/mL, punto inicial para preparar las diluciones de la curva estándar. Se prepararon diluciones seriadas de orden 10, utilizando para ello 9 tubos Eppendorf, los cuales contenían 90 μ L de buffer de elución. El primero de ellos, recibió a partir del tubo inicial, 10 μ L de solución de ADN equivalente a 1×10^6 parásitos por mL. A partir de este punto, cada uno de los tubos siguientes recibió 10 μ L de solución desde el tubo anterior hasta completar los 10 puntos de dilución (Figura 1).

Figura 1: Metodología de dilución. A partir de un tubo inicial que contiene ADN equivalente a una concentración de 1×10^6 /mL, se preparan diluciones seriadas de orden 10.



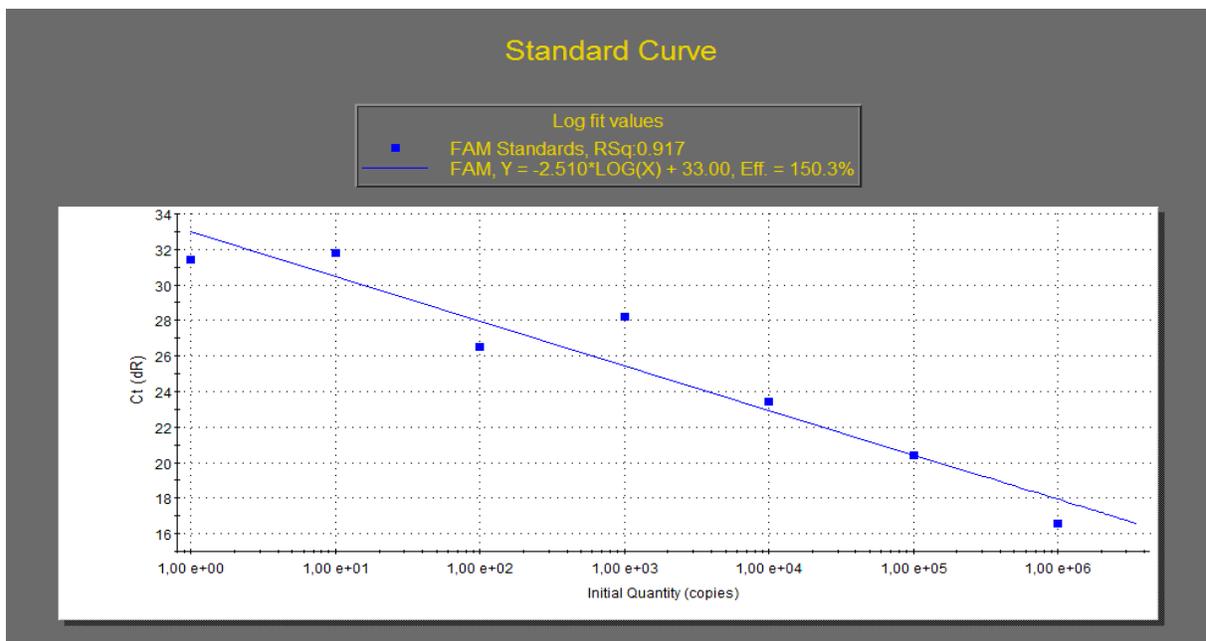
De igual forma, se generaron diluciones seriadas de orden de 5 a partir de ADN humano cuantificado según se describe previamente, con el fin de generar una curva estándar de qPCR de ADN humano que permitiera la creación de un sistema control para la reacción de qPCR destinada a determinar la carga parasitaria dada por *T. cruzi* en pacientes con ECh crónica.

4.3.6. Reacción de qPCR para *T. cruzi* y X12 con sistema de detección TaqMan®.

Previamente, antes de establecer las condiciones de estandarización finales para la reacción de qPCR dirigida a la detección y posterior cuantificación de *T. cruzi* en muestras de pacientes con ECh crónica, se evaluó el uso de curvas de estandarización realizadas a partir de formas epimastigotas completas de *T. cruzi* (Figura 2) y curvas a partir de ADN de *T. cruzi* obtenido luego del proceso de extracción y purificación, evaluadas ambas por medio de la metodología de detección SYBR® Green y el uso de los partidores Cruzi 1 y Cruzi 2. La evaluación de la curva estándar generada a partir de parásitos completos, da cuenta de un proceso de dilución deficiente, reflejados en los parámetros de evaluación de toda curva

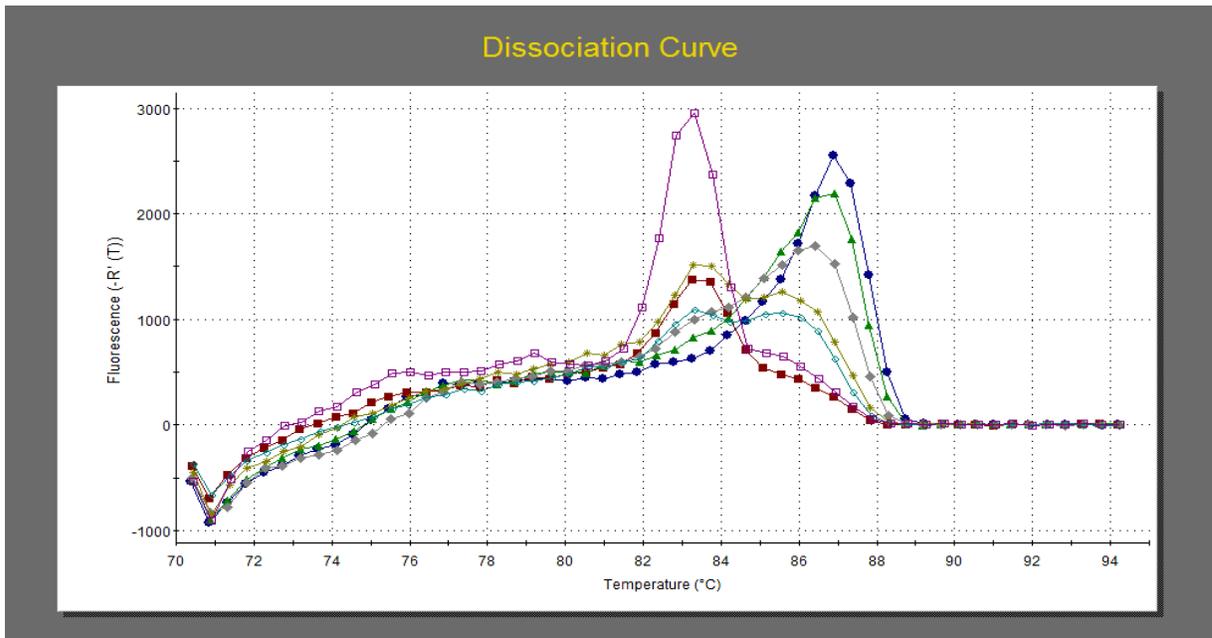
estándar. Tanto el coeficiente de determinación (R^2), pendiente de la curva obtenida y eficiencia de reacción de qPCR no fueron óptimos.

Figura 2: Curva estándar a partir de formas epimastigotas completas de *T. cruzi* para la reacción de qPCR con sistema de detección SYBR® Green.



En el informe de Unidad de Investigación titulado “Implementación de la curva estándar de PCR tiempo real para la cuantificación de *Trypanosoma cruzi* en sangre de individuos chagásicos crónicos” para el Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile, durante el periodo 2010-2011, cuya tutora fue la Directora de esta tesis (Informe de Avance 2010, Proyecto Fondecyt 1100768), los resultados dan cuenta de un mejor proceso de obtención de los distintos estándares de cuantificación, cuando estos son generados a partir de diluciones seriadas a partir de ADN parasitario perteneciente a *T. cruzi*. Además, la evaluación de los estándares de *T. cruzi* de la curva de melting obtenida con el método de detección SYBR® Green, da cuenta de dos amplicones generados a partir de los partidores Cruzi 1 y Cruzi 2 (T_m 83 y 86°C, Figura 3), situación que dificulta la correcta interpretación y evaluación de pacientes con ECh crónica.

Figura 3: Curva de melting de los estándares de *T. cruzi* evaluados bajo el sistema de detección SYBR® Green.



Enfrentadas estas dificultades, se decidió adoptar las recomendaciones ofrecidas por investigadores expertos en el diagnóstico molecular de la ECh, en el marco del XX Congreso Latinoamericano de Parasitología, el XV Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical y el curso pre-congreso de Epidemiología Molecular de Parásitos llevados a cabo en Septiembre del año 2011, en la ciudad de Bogotá, Colombia. Las recomendaciones recibidas fueron dirigidas hacia el uso de la metodología de detección en base al uso de sondas específicas TaqMan®, dada su mayor especificidad y facilidad en la interpretación de los resultados obtenidos. A partir de los resultados generados en la Unidad de Investigación previamente nombrada, junto con las recomendaciones realizadas, se decidió adoptar la metodología de detección TaqMan® junto con una curva estándar realizada a partir de ADN de *T. cruzi*. Se evaluó distintas concentraciones de los partidores Cruzi 1, Cruzi 2 y sonda Cruzi 3 para así determinar las condiciones de mezcla y perfil térmico de reacción nombradas con anterioridad en la metodología de qPCR.

De esta forma, la carga parasitaria fue determinada a través de la cuantificación mediante qPCR aplicando el sistema de detección TaqMan®, en un termociclador Mx3000P™ Stratagene (Agilent Technologies) en condiciones sugeridas por el fabricante y

utilizando los partidores de ADN satelital Cruzi 1 (5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3') y Cruzi 2 (5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3') (Piron *et al.*, 2007) a una concentración de 0,5 μ M y la sonda de ADN satelital Cruzi 3 (5'-CACACACTGGACACCAA-3') (Piron *et al.*, 2007) en una concentración de 0,2 μ M (Integrated DNA Technologies) utilizando para esta última FAMTM como fluoróforo reportero e IB®FQ como quencher, considerando además una modificación adicional en la síntesis de este oligonucleótido, que tiene relación con la incorporación de ZENTM como quencher interno, el cual, acorde al fabricante, disminuye la fluorescencia de fondo (background) y aumenta la señal específica emitida. Se trabajó en una campana de flujo laminar evitando el exceso de luz directa durante el procedimiento. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 2 μ L de la muestra a investigar, 10 μ L de Brilliant Multiplex QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 0,5 μ L de una solución 1:500 de Reference Dye (Agilent Technologies), 1 μ L de cada uno de los oligonucleótidos satelitales Cruzi 1 y Cruzi 2, 0,4 μ L de la sonda Cruzi 3, 0,2 μ L de BSA 100x (New England) y 4,9 μ L de Molecular Biology Grade Water (Mo Bio) para un volumen final de reacción de 20 μ L. Este ensayo consideró el uso de controles negativos (control agua, mezcla de reacción y purificado de paciente sin ECh) y positivos (purificado de paciente con ECh)

Adicionalmente, se creó y aplicó un sistema de control interno endógeno (CIE), utilizando parte de una secuencia del cromosoma 12 humano (X12). El CIE ha sido diseñado para descartar los casos de falsos negativos debido a ausencia de ADN en la muestra evaluada (Bravo *et al.*, 2012). De este modo, el CIE sirve tanto como control de extracción de ADN, como control de reacción de qPCR. Si una misma muestra evaluada tanto para *T. cruzi* como para X12 muestra un resultado negativo para ambos ensayos, esa reacción es considerada como inválida puesto que el resultado es debido a ausencia de ADN en la reacción. Todo resultado negativo para *T. cruzi* es validado solo si la reacción para X12 del mismo paciente evaluado es positiva. Se utilizaron los partidores N1X12 forward (5'-AGCTGGCTAGACTGTCAT-3'), N2X12 reverse (5'-CTTTGCCGTTGAAGCTTG-3') a una concentración de 1 μ M y se diseñó una sonda compatible con el sistema creado con anterioridad utilizando el software AmplifX v.1.5.4 (N.Jullien) y luego se comparó las secuencias del sistema X12 utilizando el Nucleotide BLAST (National Library of Medicine) para así descartar cualquier amplificación inespecífica. La sonda N3X12 (5'-

TGGGACTTCAGAGTAGGCAGATCG-3') utilizada en una concentración de 0,4 μM (Integrated DNA Technologies), se basa en el mismo sistema reportero y quencher aplicado para la sonda *Cruzi* 3. De esta forma, la mezcla de reacción estuvo compuesta por 2 μL de la muestra a investigar, 10 μL de Brilliant Multiplex QPCR Master Mix (Agilent Technologies), 0,5 μL de una solución 1:500 de Reference Dye (Agilent Technologies) y agua libre de nucleasas (30 nM), 2 μL de cada uno de los oligonucleótidos N1X12 y N2X12, 0,8 μL de la sonda N3X12, 0,2 μL de BSA 100x (New England) y 2,5 μL de Molecular Biology Grade Water (Mo Bio) para un volumen final de reacción de 20 μL . Este ensayo consideró el uso de controles negativos (control agua, mezcla de reacción y purificado de deyección de XD de 90 días) y positivos (purificado de sangre humana).

El perfil térmico utilizado para ambas reacciones de qPCR consistió en 10 minutos de pre-incubación de a 95°C y 40 ciclos de amplificación (95°C por 15 segundos y 60°C por 60 segundos) El registro de la fluorescencia emitida se realizó a 60°C al final de cada ciclo. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software MxPro-Mx3000P v4.10 (Stratagene). Se evaluó parámetros como coeficiente de determinación (R^2), pendiente de la curva estándar obtenida, intercepto y eficiencia de la reacción de qPCR tanto para la cuantificación de *T. cruzi* como para el sistema control X12. Las mediciones de cuantificación obtenidas fueron exportadas a un archivo de Microsoft Excel 2010.

5. Análisis estadístico

Los datos generados fueron evaluados mediante el software STATA SE v.11, InfoStat/E y Microsoft Excel 2010. Para el análisis de sensibilidad y especificidad de la reacción de qPCR dirigida a *T. cruzi*, se utilizaron 50 muestras, 25 de ellas correspondientes a individuos con ECh y las restantes pertenecientes a individuos sin ECh, condición determinada en conjunto mediante serología (IFI y/o ELISA IgG), XD, PCR-XD y PCR-S. La sensibilidad de un test, corresponde a la proporción de enfermos que el test identifica como positivos o bien, estadísticamente descrita como la probabilidad de obtener en el test un resultado positivo dado que el paciente este enfermo. Por otra parte, la especificidad de un test corresponde a la proporción de sanos que el test identifica como negativos o bien,

estadísticamente descrita como la probabilidad de obtener en el test un resultado negativo dado que el paciente este sano (Dohoo *et al.*, 2003).

Para determinar la concordancia dentro de cada grupo XD (+) y XD (-) en la pre y post-terapia con NFX, se determinó la concordancia observada (casos diagnosticados como positivos en común) entre PCR-XD, PCR-S y qPCR respecto a XD, dado que el resultado de éste último determinó la categorización de ambos grupos, para luego determinar la magnitud y la significancia de las posibles diferencias encontradas en las proporciones de casos positivos diagnosticados como tales por cada técnica. De igual forma, se realizó comparaciones entre los ensayos PCR-XD/PCR-S y PCR-S/qPCR. Para determinar diferencias entre una misma metodología diagnóstica en condiciones pre y post-terapia con NFX, se realizó el test no paramétrico de McNemar basado en la distribución de χ^2 con un nivel de significación de 0,05. Bajo este test estadístico, para cada grupo XD (+) y XD (-) se somete a prueba la hipótesis nula de que la proporción de individuos positivos a una técnica diagnóstica parasitológica en condiciones pre-terapia, es igual a la proporción de individuos positivos a la misma técnica diagnóstica parasitológica luego del tratamiento con NFX, contrastándola con una hipótesis alternativa en la cual si existen diferencias en las proporciones obtenidas. Un test de McNemar no significativo indica que las dos proporciones de casos positivos obtenidos mediante las metodologías diagnósticas comparadas, no difieren. En el caso de ser significativas las diferencias entre las proporciones, la evaluación mediante el índice kappa será baja (Dohoo *et al.*, 2003).

Los datos cuantitativos obtenidos mediante qPCR, fueron consolidados en tablas de series agrupadas. Luego, se realizó un test de Shapiro-Wilk y un test de Levene con el fin de verificar la normalidad y homocedasticidad de los grupos XD (+) y XD (-) en condiciones previas al tratamiento con NFX. El test de Shapiro-Wilk plantea la hipótesis nula de que existe distribución normal en la variable estudiada (parásitos/mL), mientras que el test de Leneve plantea la hipótesis nula de igualdad de varianzas entre los grupos comparados. Finalmente, los resultados fueron presentados en forma descriptiva.

6. Medidas de bioseguridad

Se consideró las medidas generales de bioseguridad contempladas en un laboratorio de investigación (eliminación de material infectante, restos biológicos, limpieza de superficies, etc.). Además, se consideró medidas especiales de seguridad para la realización de la técnica de XD. Fue obligatorio el uso de delantal, guantes de procedimiento, antiparras y mascarilla con el fin de evitar el contacto con deyecciones de triatomíneos que podrían contener la forma infectante de *T. cruzi*. Además se eliminó todo material contaminado en una solución de hipoclorito de sodio. Estas medidas de bioseguridad, están contempladas en el Proyecto Fondecyt 1100768 aprobado y en cuyo marco se efectúa la presente investigación.

VII. RESULTADOS

1. Estandarización de la reacción de qPCR para *T. cruzi* y X12 mediante sistema de detección TaqMan®

1.1 Cuantificación de ADN parasitario y ADN humano

La cuantificación de ADN parasitario total realizada con el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit en el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene fue llevada a cabo para establecer la cantidad de ADN de *T. cruzi* equivalente al punto más alto establecido (ADN equivalente a 1×10^6 parásitos/mL) para construir la curva estándar de qPCR. Este análisis cuantitativo determinó que la cantidad de ADN presente en la muestra en triplicado de epimastigotes provenientes de cultivo axénico fue de 10,09 ng/μL en promedio (Figura 4, Tabla 2)

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

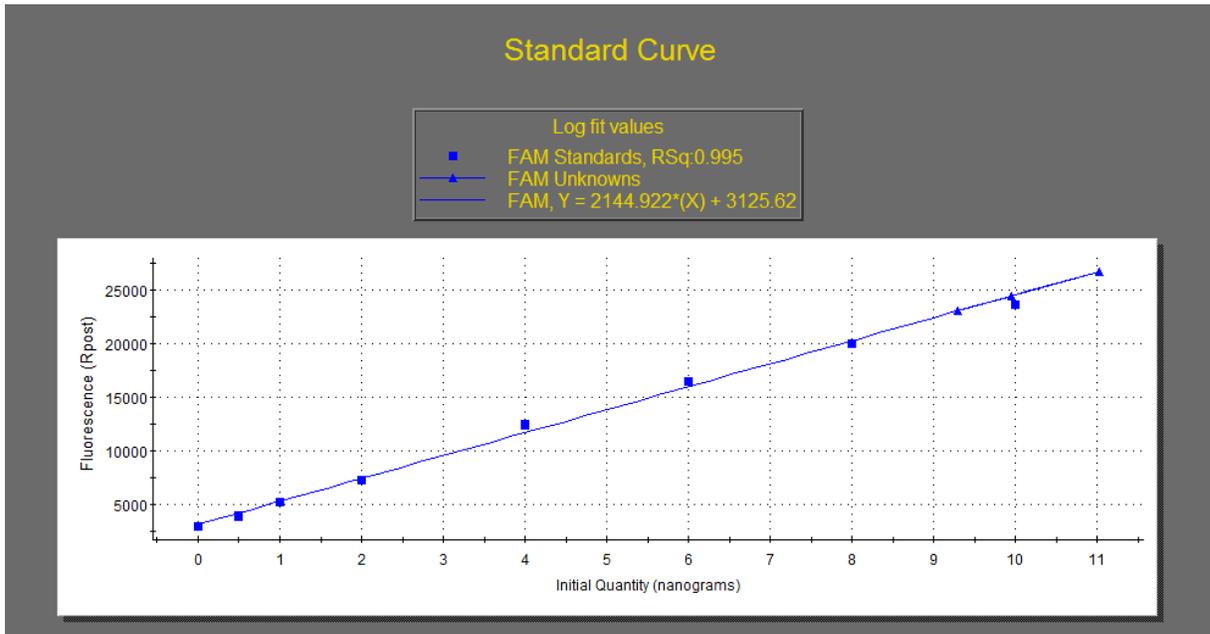


Tabla 2: Resultado de cuantificación de ADN total de *T. cruzi* mediante el kit AccubluTM High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).

Tipo de Pocillo	Nombre del Pocillo	Cantidad Promedio
Estándar	0 ng ADN estándar	0,000e+000
Estándar	0,5 ng ADN estándar	5,00E+02
Estándar	1 ng ADN estándar	1,00E+03
Estándar	2 ng ADN estándar	2,00
Estándar	4 ng ADN estándar	4,00
Estándar	6 ng ADN estándar	6,00
Estándar	8 ng ADN estándar	8,00
Estándar	10 ng ADN estándar	1,00E+04
Desconocido	8,9x10 ⁶ parásitos	1,01E+04

El ADN de *T. cruzi* equivalente a 1×10^6 parásitos por mL fue diluida en orden de 10 con el fin de generar una curva estándar de cuantificación para qPCR con un límite superior de 1×10^6 parásitos por mL hasta un límite inferior de 1×10^{-1} parásitos por mL. La cuantificación del pool ADN humano sanguíneo generado se llevó a cabo en condiciones similares, estableciendo que la cantidad de ADN presente fue de 2,59 ng/ μ L (Figura 5, Tabla 3).

Figura 5: Curva estándar de cuantificación de ADN humano total mediante el kit AccuBlueTM High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).

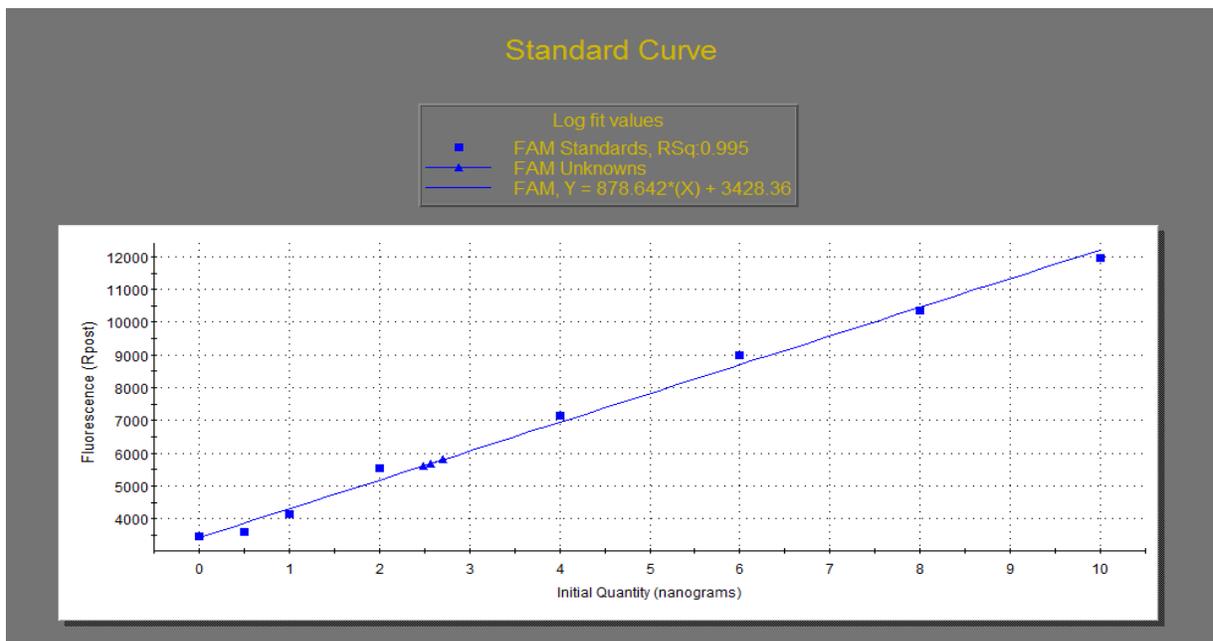


Tabla 3: Resultado de cuantificación de ADN humano total mediante el kit AccubluTM High Sensitivity dsDNA Quantitation (Biotium).

Tipo de Pocillo	Nombre del Pocillo	Cantidad Promedio
Estándar	0 ng ADN estándar	0,000e+000
Estándar	0,5 ng ADN estándar	5,00E+02
Estándar	1 ng ADN estándar	1,00E+03
Estándar	2 ng ADN estándar	2,00
Estándar	4 ng ADN estándar	4,00
Estándar	6 ng ADN estándar	6,00
Estándar	8 ng ADN estándar	8,00
Estándar	10 ng ADN estándar	1,00E+04
Desconocido	ADN Humano	2,59

1.2 Reacción de qPCR para la detección de *T. cruzi*.

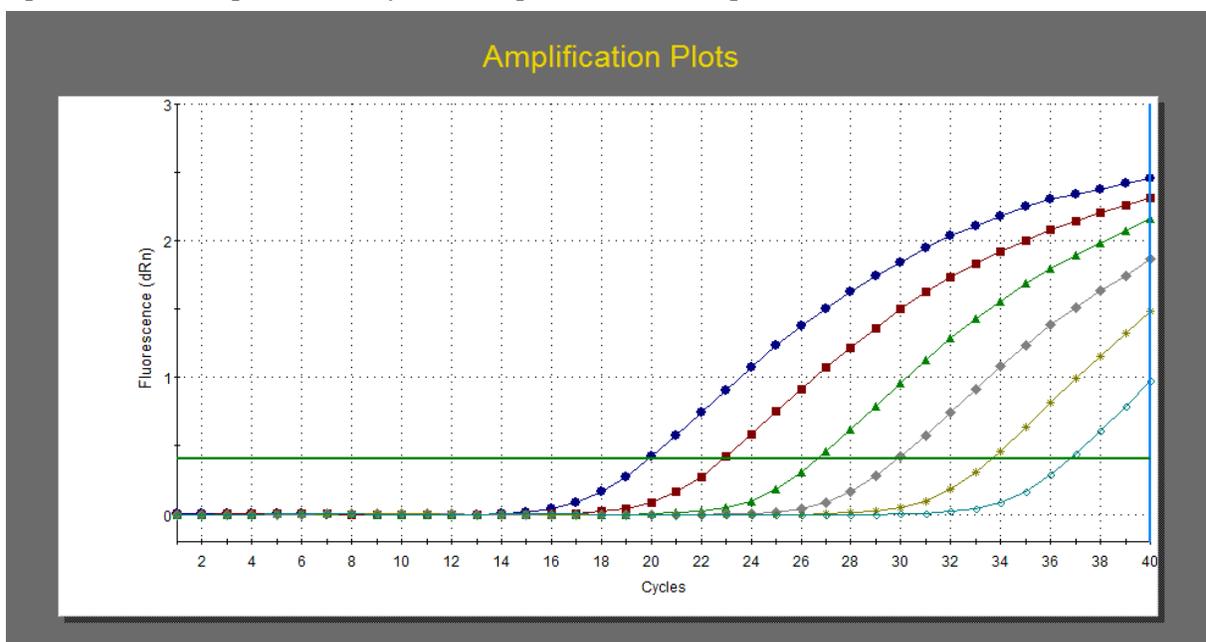
Bajo las condiciones establecidas en la metodología, se evaluó la curva estándar construida a partir del ADN parasitario cuantificado mediante el método anteriormente descrito. Junto a esto, se evaluó un set de 50 muestras, 25 correspondientes a individuos con ECh y las restantes pertenecientes a individuos sin ECh, condición determinada mediante serología convencional (IFI y/o ELISA IgG), XD, PCR-XD y PCR-S.

Los resultados obtenidos del análisis de la curva estándar generada determinan un rango dinámico de cuantificación entre los puntos que representan el ADN equivalente a 1×10^6 parásitos/mL y el ADN equivalente a 1×10^0 parásitos/mL. Los estándares generados inferiores a éste último fueron omitidos puesto que no fueron capaces de ser detectados por el sistema en evaluación, por lo que cantidades menores de *T. cruzi* pero suficientes para generar señal de amplificación, fueron consideradas en los ensayos posteriores como menores a 1 parásito por mL (<1 parásito/mL). De igual forma, se descartó el primer punto de la curva (1×10^6) puesto que este no es necesario para la cuantificación de pacientes en la etapa crónica de la enfermedad, dado las bajas parasitemias evidenciados por éstos en ensayos preliminares.

La curva de amplificación de cada uno de los 6 estándares evaluados (Figura 6) evidencia señal de amplificación para todos ellos. Las señales de amplificación de los estándares utilizados se obtienen en tiempo real durante el transcurso de la reacción y aparecen de acuerdo a la cantidad de ADN presente en cada uno de ellos. De esta forma, el primer

estándar generado (1×10^5 parásitos/mL, curva azul, Figura 6) es el primero en amplificar puesto que su alta cantidad de ADN permite un aumento significativo de la señal de fluorescencia por sobre el threshold o punto de corte de la técnica (línea horizontal color verde), a menor ciclo de qPCR (menor Ct). En forma sucesiva y en tiempo real, los estándares restantes amplifican con una diferencia entre punto y punto de poco más de 3 ciclos de reacción. Todos los estándares generados permiten la evaluación de la carga parasitaria de pacientes con ECh.

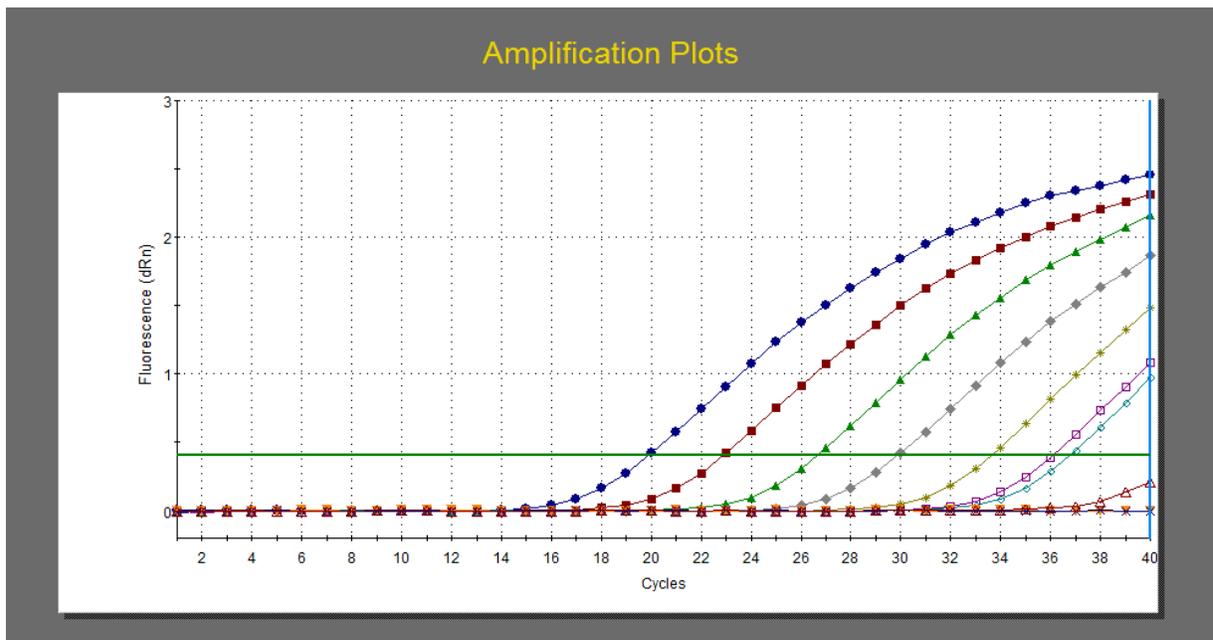
Figura 6: Curva de amplificación de los 6 estándares de ADN de *T. cruzi* generados mediante qPCR con sistema de detección TaqMan®. Rango de cuantificación entre los puntos que representan el ADN equivalente a 1×10^5 parásitos/mL y el ADN equivalente a 1×10^0 parásitos/mL.



Cada reacción generada para la evaluación de la condición parasitológica de pacientes con ECh, consideró la utilización de un control positivo consistente en purificado de sangre perteneciente a paciente con ECh, condición determinada con serología convencional (IFI y/o ELISA IgG) XD, PCR-XD y PCR-S. Además, cada reacción consideró 3 controles negativos: purificado de sangre de paciente sin ECh (determinado con las pruebas mencionadas con anterioridad), un control de la mezcla de reacción (a la cual no se agregó templado de ADN) y un control agua (se agregó la misma agua usada para la preparación de la mezcla de reacción en remplazo de templado de ADN). Estos 2 últimos controles descartan contaminación de la mezcla de reacción utilizada en el qPCR y la contaminación del agua utilizada para la

preparación de la reacción, respectivamente. En la Figura 7, se observa la misma curva de amplificación para cada uno de los 6 estándares de ADN de *T. cruzi* generados, considerando además el control positivo utilizado (Figura 7, curva de amplificación color rosa ubicada entre los estándares 1×10^1 y 1×10^0 parásitos/mL) y los controles negativos. Estos últimos se encuentran por debajo del threshold (línea horizontal color verde), el cual fue determinado en forma automática por el software MxPro–Mx3000P v4.10.

Figura 7: Curva de amplificación de los 6 estándares de ADN de *T. cruzi* generados considerando los controles de reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.

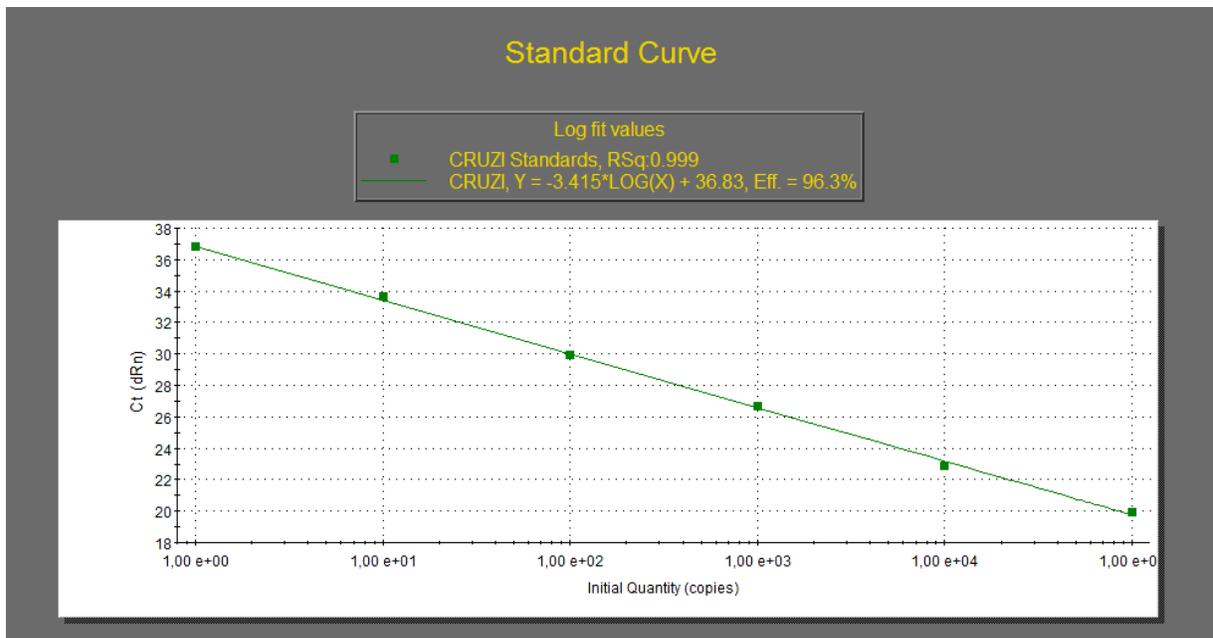


En lo que respecta al análisis de la curva estándar (Figura 8), cada uno de los 6 estándares de cuantificación generados se distancia del siguiente en poco más de 3 ciclos de reacción, relacionándose con la pendiente de la curva estándar generada y cumpliendo además con las condiciones óptimas de evaluación para el R^2 y eficiencia de reacción de qPCR. Se considera que una curva estándar correctamente construida y evaluada mediante un software de análisis de reacción de qPCR, debe poseer una pendiente que se ubique entre los valores -3,1 y -3,6. Además, el R^2 debe ser superior a 0,98 y la eficiencia de la reacción puede variar entre un 90% a un 110% (Agilent Technologies, 2010). En el caso de la evaluación de la curva estándar obtenida, el coeficiente de determinación fue de 0,999, lo que determina que los Ct obtenidos en esta curva estándar explican en un 99,9 % la variación originada en la cantidad

de ADN de *T. cruzi* evaluada en cada uno de los 6 estándares, mientras que el porcentaje restante se debe al azar. La pendiente fue de $-3,415$, lo que determina un distanciamiento promedio de 3,415 ciclos de reacción entre cada uno de los 6 estándares de ADN evaluados. El intercepto de la curva originada representa el Ct correspondiente a la amplificación del estándar de ADN de *T. cruzi* de menor concentración (1×10^6 parásitos/mL) y por tanto, se relaciona con la sensibilidad de cuantificación de la técnica estandarizada. En esta evaluación, tuvo un valor de 36,83. La eficiencia de la reacción de qPCR fue de un 96,3 %.

Esta misma curva estándar fue utilizada tanto para la evaluación de la especificidad y sensibilidad de la reacción estandarizada, como para la evaluación de los pacientes con ECh pertenecientes a los grupos XD (+) y XD (-).

Figura 8: Curva estándar a partir de ADN de *T. cruzi* para la reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.



1.3 Evaluación de la especificidad y sensibilidad de la reacción de qPCR para la detección de *T. cruzi*.

En el análisis de las 25 muestras de sangre provenientes de pacientes sin ECh, la totalidad de estas no evidenció amplificación. De las 25 muestras de sangre de pacientes con ECh, 23 de éstas amplificaron. Con los resultados obtenidos se creó una tabla de contingencia para luego analizar los datos obtenidos mediante el software STATA SE v.11.

Tabla 4: Tabla de contingencia para qPCR *T. cruzi*, según resultado diagnóstico

		Serología, XD, PCR-XD y PCR-S		
		Positivos	Negativos	Total
qPCR TaqMan® <i>T. cruzi</i>	Positivos	23	0	23
	Negativos	2	25	27
		25	25	50

Especificidad: 100%, Sensibilidad: 92%

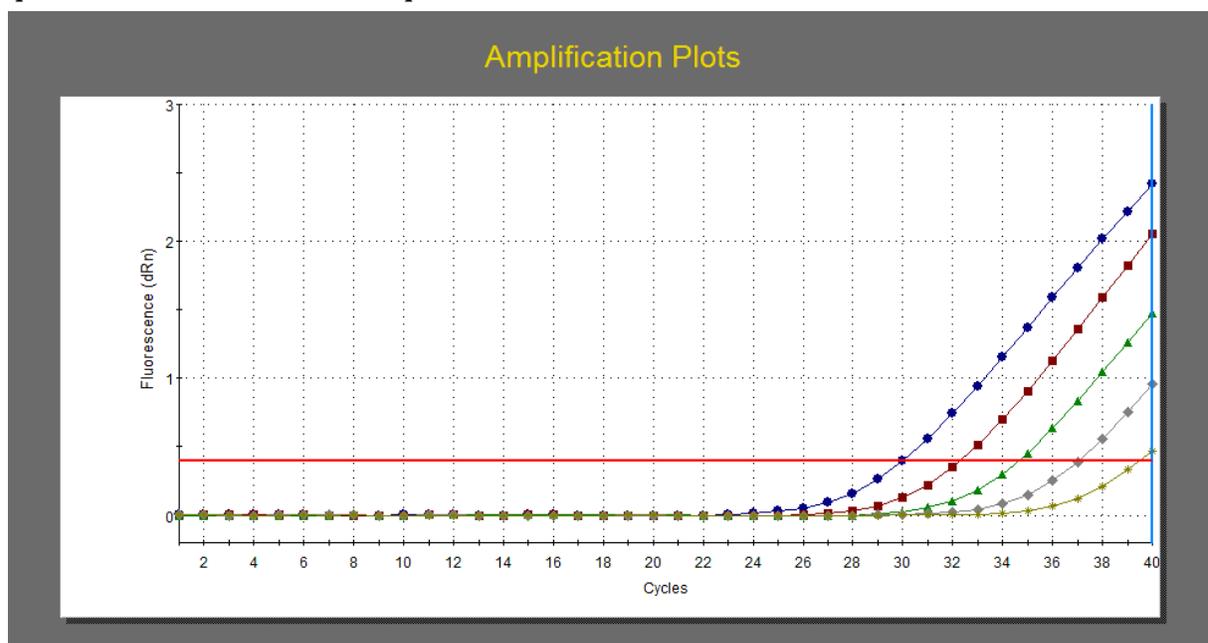
La Tabla 4 muestra los resultados del análisis bajo el sistema de detección TaqMan®. La totalidad de los casos negativos reales fueron detectados como tales (Especificidad= 100%). Por otro lado, el 92% de casos positivos reales fueron detectados como tales (Sensibilidad= 92%).

1.4 Reacción de qPCR para la detección de X12

Se evaluó la curva estándar construida a partir del ADN sanguíneo humano cuantificado mediante el método anteriormente descrito. Se evaluaron las mismas muestras utilizadas para la estandarización de la reacción de qPCR dirigidas a *T. cruzi*.

Los resultados obtenidos del análisis de la curva estándar generada determinan un rango de detección entre los puntos que representan el ADN equivalente a 2,59 a 0,004 ng/ μ L. La curva de amplificación de cada uno de los 5 estándares de ADN humano evaluados evidencia amplificación de la totalidad de los estándares que conforman la curva estándar de qPCR para X12 (Figura 9).

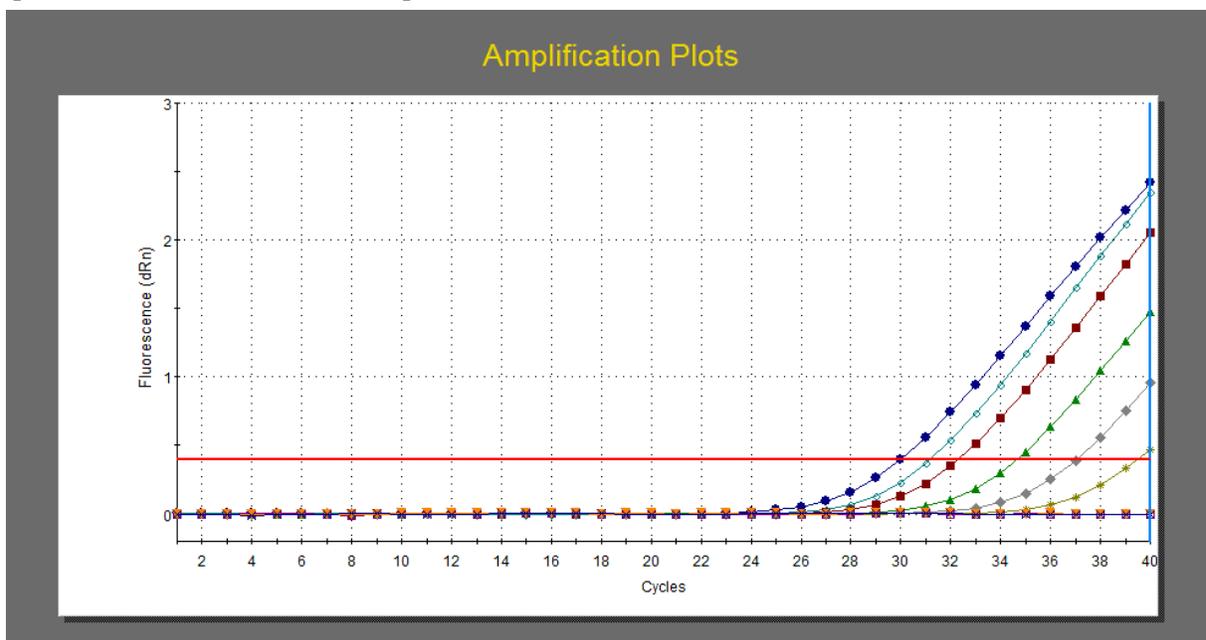
Figura 9: Curva de amplificación de los 5 estándares de ADN humano generados mediante reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan®.



Cada reacción de qPCR para X12 consideró la utilización de un control positivo consistente en purificado de sangre humana. Además, cada reacción consideró 3 controles negativos: purificado de deyecciones de vinchucas obtenidas luego de 90 días de cultivo en XD aplicado a pacientes con ECh, un control de la mezcla de reacción (a la cual no se agregó templado de ADN) y un control agua (se agregó agua en remplazo de templado de ADN). El primer control negativo es considerado, puesto que existe evidencia de que no existe ADN

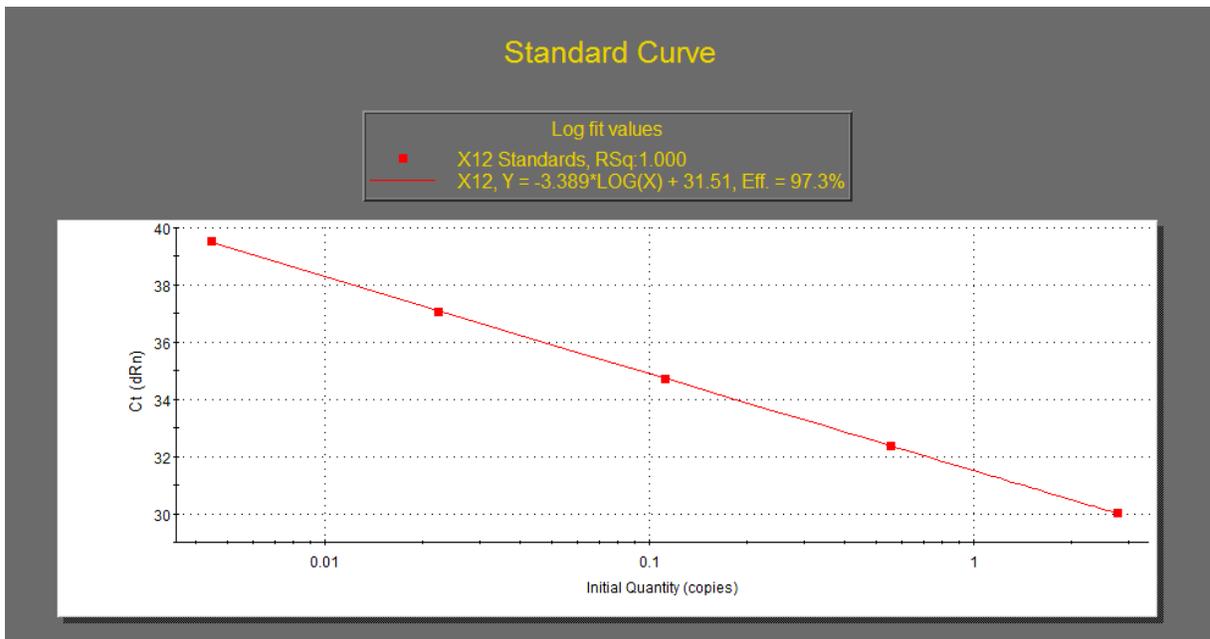
humano en deyecciones de vinchucas luego de 30, 60 y 90 días de cultivo en XD (Bravo, *et al.* 2012). Los 2 últimos controles descartan contaminación de la mezcla de reacción utilizada en el qPCR y del agua utilizada para la preparación de la reacción, respectivamente. En la figura 10, se evidencia la misma curva de amplificación para cada uno de los 5 estándares de ADN humano, considerando además el control positivo utilizado (curva de amplificación color celeste ubicada entre el primer y segundo estándar) y los controles negativos. Estos últimos se encuentran por debajo del threshold (línea horizontal color rojo), el cual fue determinado en forma automática por el software MxPro–Mx3000P v4.10.

Figura 10: Curva de amplificación de los 5 estándares de ADN humano generados mediante reacción de qPCR con sistema de detección TaqMan® considerando los controles de reacción.



En el análisis realizado de la curva estándar para la reacción de qPCR para X12 (Figura 11), el coeficiente de determinación fue de 1, lo que determina que los Ct obtenidos en esta curva estándar explican en un 100 % la variación originada en la cantidad de ADN humano evaluado en cada uno de los 5 estándares generados. La pendiente fue de $-3,389$ y la eficiencia de la reacción de qPCR fue de un 97,3 %. El objetivo de construir una curva estándar de ADN humano para qPCR fue el comparar esta reacción con la obtenida en la reacción de qPCR de *T. cruzi*. En ambas, los parámetros de evaluación se asemejan. No obstante, el ensayo fue considerado como un ensayo cualitativo de X12 y no de cuantificación.

Figura 11: Curva estándar de ADN humano (X12) para qPCR



En el análisis de las muestras de sangre evaluadas, la totalidad de estas mostraron amplificación para X12, evidenciando presencia de ADN humano en las muestras extraídas y por tanto, mostrando de esta forma la utilidad del control X12. En el caso de no detectar señal de X12 en una muestra de sangre purificada sujeta a estudio, ésta se eliminó, repitiendo el proceso de extracción de ADN.

Tanto la reacción de qPCR para la detección de *T. cruzi*, como la reacción que detecta ADN humano en base a parte de la secuencia que codifica para X12 y que funciona como método de control de extracción de ADN, fueron estandarizadas con éxito y puestas a disposición para la evaluación de pacientes con ECh crónica.

2. Evaluación pre y post-terapia de pacientes con enfermedad de Chagas

Los 44 pacientes con ECh evaluados, cumplieron con todos los criterios de inclusión de este estudio antes, durante y posterior al tratamiento con NFX. Luego de la conformación de los grupos, y como se mencionó anteriormente, el periodo de seguimiento para el grupo XD (+) varió entre 1-18 meses desde que se finalizó el tratamiento con NFX, mientras que el periodo de seguimiento obtenido para el grupo XD (-) varió entre 1 y 17 meses. Todos los individuos fueron serológicamente positivos a *T. cruzi* tanto en pre como post-terapia.

2.1 Grupo xenodiagnóstico positivo

2.1.1 Xenodiagnóstico

En la condición pre-terapia, todos los individuos de este grupo presentaron XD positivo (100% de detección de *T. cruzi*), al menos en una de las tres mediciones realizadas (30, 60 y/o 90 días), puesto que precisamente éste fue el criterio de inclusión para este grupo. Cinco de estos pacientes fueron XD positivo en las 3 mediciones realizadas. El XD aplicado post-terapia evidencia negativización de la condición parasitológica de los 22 pacientes (Tabla 5), por lo que es posible estimar que con esta herramienta, que el 100% de los pacientes pertenecientes a este grupo revierte su condición parasitológica determinada mediante XD en el primer seguimiento post-terapia con NFX.

Tabla 5: Resultados del xenodiagnóstico pre y post-terapia del grupo XD (+), según período de observación

N° Caso	PRE-TERAPIA			N° CASO	Seguimiento	POST-TERAPIA			Parasitemia
	XD 30 días	XD 60 días	XD 90 días			XD 30 días	XD 60 días	XD 90 días	
2019	-	-	+	2544	9 meses	-	-	-	Elimina
1663	+	-	-	2298	8 meses	-	-	-	Elimina
503	-	+	S/M	1824	4 meses	-	-	-	Elimina
1208	+	+	+	1743	2 meses	-	-	S/M	Elimina
892	+	+	+	2324	8 meses	-	-	-	Elimina
1398	-	+	S/M	1749	10 meses	-	-	S/M	Elimina
1292	+	+	+	2545	11 meses	-	-	S/M	Elimina
1282	+	+	+	1724	1 mes	-	-	S/M	Elimina
1227	+	+	+	1401	1 mes	-	-	-	Elimina
1402	+	+	S/M	1863	16 meses	-	-	-	Elimina
754	+	S/M	S/M	1897	12 meses	-	-	-	Elimina
1966	-	+	+	2403	7 meses	-	-	-	Elimina
1478	+	+	S/M	2133	2 meses	-	-	S/M	Elimina
1861	+	-	+	2283	2 meses	-	-	S/M	Elimina
508	-	+	S/M	1826	17 meses	-	-	-	Elimina
511	+	+	S/M	1967	18 meses	-	-	-	Elimina
1207	+	+	+	2617	8 meses	-	-	S/M	Elimina
1739	-	+	S/M	2236	4 meses	-	-	S/M	Elimina
583	+	+	S/M	1747	10 meses	-	-	S/M	Elimina
2223	+	+	S/M	2586	5 meses	-	-	S/M	Elimina
1728	+	-	S/M	2018	3 meses	-	-	-	Elimina
1836	+	+	-	2238	2 meses	-	-	S/M	Elimina

S/M= Sin medición debido a mortalidad de los triatominos

2.1.2 PCR-XD

El PCR realizado del pool de deyecciones de XD obtenidas a los 30, 60 y 90 días, en condiciones de pre-terapia, evidenció parasitemia en 20 de 22 casos (Figura 12, arriba), lo que representa un 90,9% de detección de *T. cruzi*. En la evaluación post-terapia, en 13 casos se detectó material genético perteneciente a *T. cruzi* (Figura 12, abajo), por lo que luego de aplicado el tratamiento con NFX, el 59,09% de los pacientes pertenecientes a este grupo mantiene su condición parasitológica positiva determinada con PCR-XD en el primer seguimiento post-terapia. En 2 casos (508 y 511) no se detectó ADN de *T. cruzi* mediante PCR-XD tanto en la condición pre como post-terapia. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 6.

Figura 12: PCR-XD pre y post-terapia del grupo XD (+)

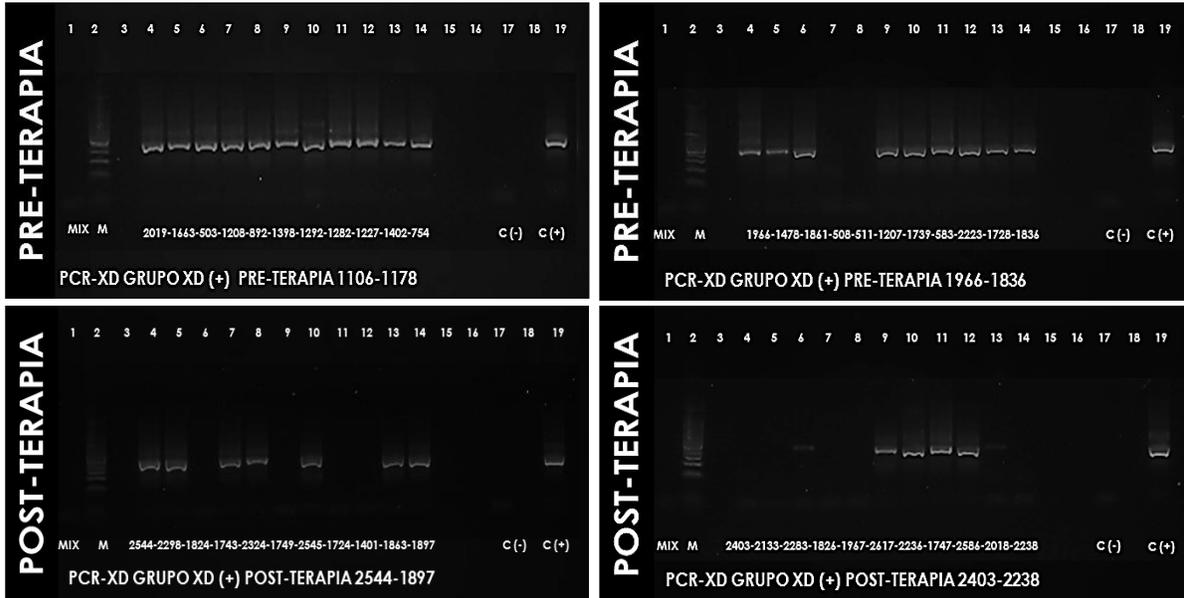


Tabla 6: Resumen de resultados de PCR-XD pre y post-terapia grupo XD (+).

PRE-TERAPIA			POST-TERAPIA		
N° CASO	PCR-XD	N° CASO	Seguimiento	PCR-XD	Parasitemia
2019	+	2544	9 meses	+	Persiste
1663	+	2298	8 meses	+	Persiste
503	+	1824	4 meses	-	Elimina
1208	+	1743	2 meses	+	Persiste
892	+	2324	8 meses	+	Persiste
1398	+	1749	10 meses	-	Elimina
1292	+	2545	11 meses	+	Persiste
1282	+	1724	1 mes	-	Elimina
1227	+	1401	1 mes	-	Elimina
1402	+	1863	16 meses	+	Persiste
754	+	1897	12 meses	+	Persiste
1966	+	2403	7 meses	-	Elimina
1478	+	2133	2 meses	-	Elimina
1861	+	2283	2 meses	+ leve	Persiste
508	-	1826	17 meses	-	No evidencia
511	-	1967	18 meses	-	No evidencia
1207	+	2617	8 meses	+	Persiste
1739	+	2236	4 meses	+	Persiste
583	+	1747	10 meses	+	Persiste
2223	+	2586	5 meses	+	Persiste
1728	+	2018	3 meses	+ leve	Persiste
1836	+	2238	2 meses	-	Elimina

2.1.3 PCR-S

El análisis de PCR realizado a los purificados de sangre, en condiciones de pre-terapia, evidenció parasitemia en todos los casos (100% de detección de *T. cruzi*) (Figura 13, arriba). La evaluación post-terapia reveló que en 11 de los 22 pacientes se detectó material genético perteneciente a *T. cruzi* (Figura 13, abajo), por lo que luego de aplicado el tratamiento con NFX, el 50% de los pacientes pertenecientes a este grupo mantiene su condición parasitológica positiva determinada con PCR-S en el primer seguimiento post-terapia. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 7.

Figura 13: Resultados de PCR-S pre y post-terapia del grupo XD (+)

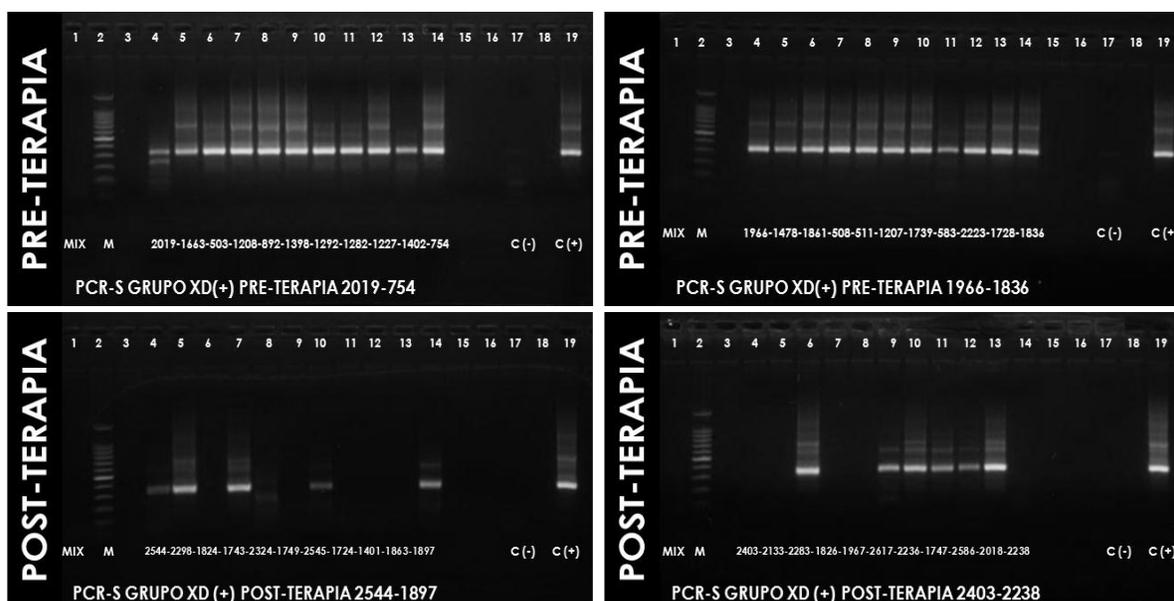


Tabla 7: Resumen de resultados de PCR-S pre y post-terapia grupo XD (+)

PRE-TERAPIA			POST-TERAPIA		
Nº CASO	PCR-S	Nº CASO	Seguimiento	PCR-S	Parasitemia
2019	+	2544	9 meses	+	Persiste
1663	+	2298	8 meses	+	Persiste
503	+	1824	4 meses	-	Elimina
1208	+	1743	2 meses	+	Persiste
892	+	2324	8 meses	-	Elimina
1398	+	1749	10 meses	-	Elimina
1292	+	2545	11 meses	+	Persiste
1282	+	1724	1 mes	-	Elimina
1227	+	1401	1 mes	-	Elimina
1402	+	1863	16 meses	-	Elimina
754	+	1897	12 meses	+	Persiste
1966	+	2403	7 meses	-	Elimina
1478	+	2133	2 meses	-	Elimina
1861	+	2283	2 meses	+	Persiste
508	+	1826	17 meses	-	Elimina
511	+	1967	18 meses	-	Elimina
1207	+	2617	8 meses	+	Persiste
1739	+	2236	4 meses	+	Persiste
583	+	1747	10 meses	+	Persiste
2223	+	2586	5 meses	+	Persiste
1728	+	2018	3 meses	+	Persiste
1836	+	2238	2 meses	-	Elimina

2.1.4 Cuantificación de *T. cruzi* mediante qPCR y control X12

Gracias al proceso de estandarización de la reacción de qPCR tanto para la cuantificación de la carga parasitaria dada por *T. cruzi*, como para la reacción control X12, fue posible determinar el número de parásitos por mL de los pacientes evaluados. Para la evaluación del grupo XD (+), fue necesario realizar 4 ensayos de qPCR. En cada uno de ellos se cargó en triplicado tanto la curva estándar de *T. cruzi* como la curva de ADN humano generadas con anterioridad. Cada muestra proveniente de un mismo paciente fue evaluada en forma simultánea y como reacción independiente, para los 2 tipos de ensayos (blanco *T. cruzi* y control X12) en duplicado, tanto para la muestra pre y post-terapia, ambas evaluadas en el mismo ensayo de qPCR. Cada ensayo realizado consideró los controles positivos y negativos descritos con anterioridad.

En todos los ensayos realizados, los parámetros de evaluación tanto de la curva estándar para la determinación de *T. cruzi*, como para la curva estándar de determinación de

ADN humano mediante la secuencia X12, fueron óptimos, al igual que los controles de reacción considerados (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11).

En todas las muestras evaluadas existió amplificación para la secuencia X12 del ADN humano, por lo que se consideró que no hubo pérdidas de material genético durante el proceso de extracción de las muestras sanguíneas que llevaran a la generación de resultados falsos negativos para *T. cruzi*. El análisis en condiciones de pre-terapia, evidenció parasitemia en todos los casos (100% de detección de *T. cruzi*). La evaluación post-terapia reveló que en 4 de los 22 pacientes la carga parasitaria es eliminada (18,18%). Destaca la muestra 2133, que en condición pre-terapia evidencia 27.780 parásitos/mL y posterior al tratamiento con NFX (muestra 1478), elimina la carga parasitaria. En 18 casos (81,81%), se mantiene la parasitemia luego del tratamiento con NFX (27,27% de ellos con <1parásito/mL). Ocho pacientes muestran disminución de su carga parasitaria (36,36%), comparada con su condición pre-terapia, mientras que en 4 casos la parasitemia aumenta (18,18%). Los restantes 6 pacientes mantienen el número de parásitos/mL circulante. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de qPCR para *T. cruzi* y control X12 del grupo XD (+)

PRE-TERAPIA qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12					POST-TERAPIA qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12							
N° CASO	<i>T. cruzi</i>	Ct <i>T. cruzi</i>	Parásitos/mL	X12	N° CASO	Seguimiento	<i>T. cruzi</i>	Ct <i>T. cruzi</i>	Parásitos/mL	X12	Ct X12	Parasitemia
2019	+	39,39	<1	+	2544	9 meses	+	36,67	<1	+	33,06	Persiste
1663	+	33,58	7,06	+	2298	8 meses	+	38,93	<1	+	29,33	Disminuye
503	+	33,05	9,92	+	1824	4 meses	+	37,41	<1	+	30,14	Disminuye
1208	+	36,24	1,28	+	1743	2 meses	-	No Ct	0	+	31,41	Elimina
892	+	37,11	<1	+	2324	8 meses	+	38,61	<1	+	31,84	Persiste
1398	+	37,38	<1	+	1749	10 meses	+	39,28	<1	+	28,95	Persiste
1292	+	39,94	<1	+	2545	11 meses	+	37,15	2,49	+	33,8	Aumenta
1282	+	36,62	3,52	+	1724	1 mes	+	39,79	<1	+	33,85	Disminuye
1227	+	35,84	5,92	+	1401	1 mes	+	39,79	<1	+	32,17	Disminuye
1402	+	38,81	<1	+	1863	16 meses	-	No Ct	0	+	29,72	Elimina
754	+	34,93	10,79	+	1897	12 meses	+	34,93	1,47	+	32,23	Disminuye
1966	+	38,76	<1	+	2403	7 meses	+	36,4	4,08	+	35,56	Aumenta
1478	+	20,74	27.780	+	2133	2 meses	-	No Ct	0	+	28,88	Elimina
1861	+	35,82	1,24	+	2283	2 meses	+	36,16	<1	+	28,93	Disminuye
508	+	35,6	1,43	+	1826	17 meses	-	No Ct	0	+	29,35	Elimina
511	+	34,86	2,35	+	1967	18 meses	+	38,69	<1	+	28,58	Disminuye
1207	+	36,88	<1	+	2617	8 meses	+	35,49	1,55	+	32,43	Aumenta
1739	+	38,41	<1	+	2236	4 meses	+	39,03	<1	+	29,05	Persiste
583	+	34,54	<1	+	1747	10 meses	+	34,95	<1	+	33,26	Persiste
2223	+	35,12	<1	+	2586	5 meses	+	32,75	2,97	+	33,74	Aumenta
1728	+	34,09	1,25	+	2018	3 meses	+	37,48	<1	+	33,19	Disminuye
1836	+	37,22	<1	+	2238	2 meses	+	36,03	<1	+	32,31	Persiste

2.2 Grupo xenodiagnóstico negativo

2.2.1 Xenodiagnóstico

En la condición pre-terapia, todos los individuos estudiados presentaron XD negativo, puesto que precisamente éste fue el criterio de selección. El XD aplicado post-terapia con NFX mantiene la condición parasitológica de los 22 pacientes, determinando que no existe persistencia de *T. cruzi* después del tratamiento (Tabla 9).

Tabla 9: Resultados de xenodiagnóstico pre y post-terapia del grupo XD (-), según período de observación

N° CASO	PRE-TERAPIA			N° CASO	Seguimiento	POST-TERAPIA			Parasitemia
	XD 30 días	XD 60 días	XD 90 días			XD 30 días	XD 60 días	XD 90 días	
1106	-	-	-	1964	17 meses	-	-	-	No Evidencia
1104	-	-	-	1676	5 meses	-	-	-	No Evidencia
1388	-	-	-	1716	3 meses	-	-	-	No Evidencia
1105	-	-	-	1680	7 meses	-	-	-	No Evidencia
1065	-	-	-	1393	1 mes	-	-	-	No Evidencia
1975	-	-	-	2235	2 meses	-	-	S/M	No Evidencia
1984	-	-	-	2240	2 meses	-	-	S/M	No Evidencia
1218	-	-	-	1400	1 mes	-	-	-	No Evidencia
1048	-	-	-	1775	8 meses	-	-	S/M	No Evidencia
1770	-	-	S/M	2131	2 meses	-	-	-	No Evidencia
1178	-	-	-	1380	1 mes	-	-	-	No Evidencia
1089	-	-	-	1381	1 mes	-	-	-	No Evidencia
1083	-	-	-	1423	1 mes	-	-	-	No Evidencia
1819	-	-	-	2152	1 mes	-	-	S/M	No Evidencia
1461	-	-	-	2155	2 meses	-	-	S/M	No Evidencia
1476	-	-	-	2139	1 mes	-	-	S/M	No Evidencia
1712	-	-	S/M	2135	1 mes	-	-	S/M	No Evidencia
1449	-	-	S/M	2153	1 mes	-	-	S/M	No Evidencia
1469	-	-	-	2166	1 mes	-	-	S/M	No Evidencia
1445	-	-	-	2141	1 mes	-	-	S/M	No Evidencia
1081	-	-	-	1873	12 meses	-	-	-	No Evidencia
1472	-	-	-	2137	2 meses	-	-	S/M	No Evidencia

S/M= Sin medición debido a mortalidad de los triatominos

2.2.2 PCR-XD

El PCR realizado del pool de deyecciones de XD obtenidas a los 30, 60 y 90 días, en condiciones de pre-terapia, evidenció parasitemia en 19 de 22 casos (86,36%) (Figura 14, arriba). La evaluación post-terapia reveló que en 12 de los 22 casos (54,54%), se detectó material genético de *T. cruzi* (Figura 14, abajo), por lo que posterior a tratamiento con NFX, el 54,54% de los pacientes pertenecientes a este grupo mantiene la parasitemia evidenciada mediante PCR-XD en el primer seguimiento post-terapia. Dos pacientes no evidencian parasitemia, mientras que en otro ésta aparece. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 10.

Figura 14: Resultados de PCR-XD pre y post-terapia del grupo XD (-)

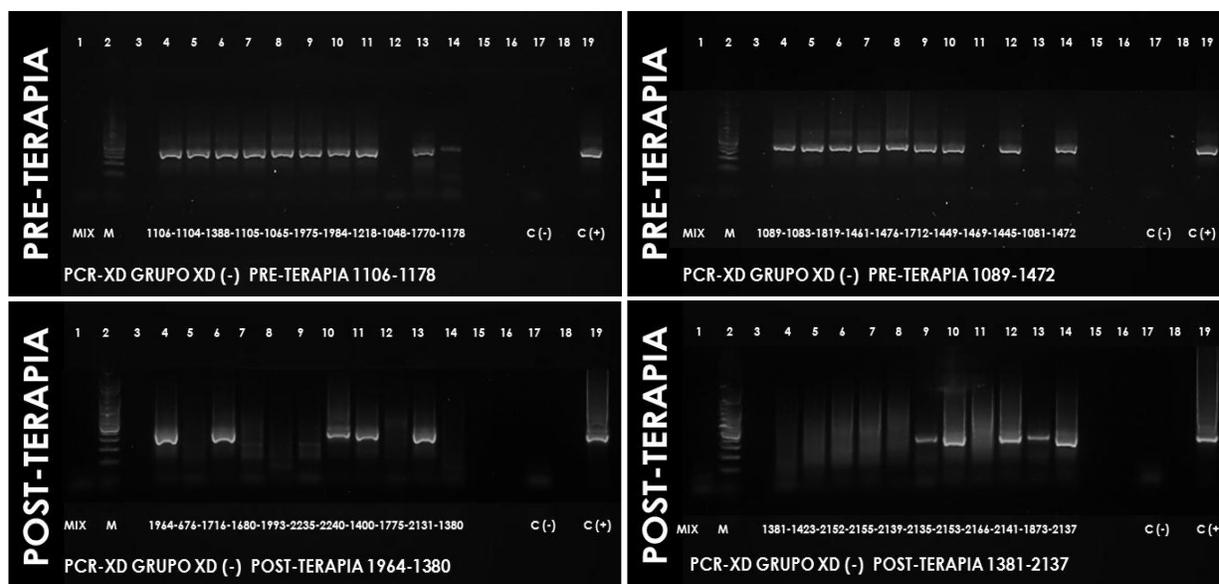


Tabla 10: Resumen de resultados de PCR-XD pre y post-terapia grupo XD (-)

PRE-TERAPIA		POST-TERAPIA			
Nº CASO	PCR-XD	Nº CASO	Seguimiento	PCR-XD	Parasitemia
1106	+	1964	17 meses	+	Persiste
1104	+	1676	5 meses	-	Elimina
1388	+	1716	3 meses	+	Persiste
1105	+	1680	7 meses	+ leve	Persiste
1065	+	1393	1 mes	-	Elimina
1975	+	2235	2 meses	+ leve	Persiste
1984	+	2240	2 meses	+	Persiste
1218	+	1400	1 mes	+	Persiste
1048	-	1775	8 meses	-	No Evidencia
1770	+	2131	2 meses	+	Persiste
1178	+ leve	1380	1 mes	-	Elimina
1089	+	1381	1 mes	-	Elimina
1083	+	1423	1 mes	-	Elimina
1819	+	2152	1 mes	-	Elimina
1461	+	2155	2 meses	-	Elimina
1476	+	2139	1 mes	-	Elimina
1712	+	2135	1 mes	+	Persiste
1449	+	2153	1 mes	+	Persiste
1469	-	2166	1 mes	-	No Evidencia
1445	+	2141	1 mes	+	Persiste
1081	-	1873	12 meses	+	Aparece
1472	+	2137	2 meses	+	Persiste

2.2.3 PCR-S

El análisis de PCR realizado a los purificados de sangre, en condiciones de pre-terapia, evidenció parasitemia en 13 casos (59,09%) (Figura 15, arriba). La evaluación post-terapia reveló que en 8 de los 22 casos (36,36%), se detectó material genético de *T. cruzi* (Figura 15, abajo), por lo que posterior al tratamiento con NFX, el 36,36% de los pacientes pertenecientes a este grupo mantiene su condición parasitológica positiva determinada mediante PCR-S en el primer seguimiento post-terapia. Ocho pacientes (36,36%) no evidencian parasitemia tanto en pre como en post-terapia. En uno de los pacientes aparece parasitemia en la post-terapia. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 11.

Figura 15: Resultados de PCR-S pre y post-terapia del grupo XD (-)

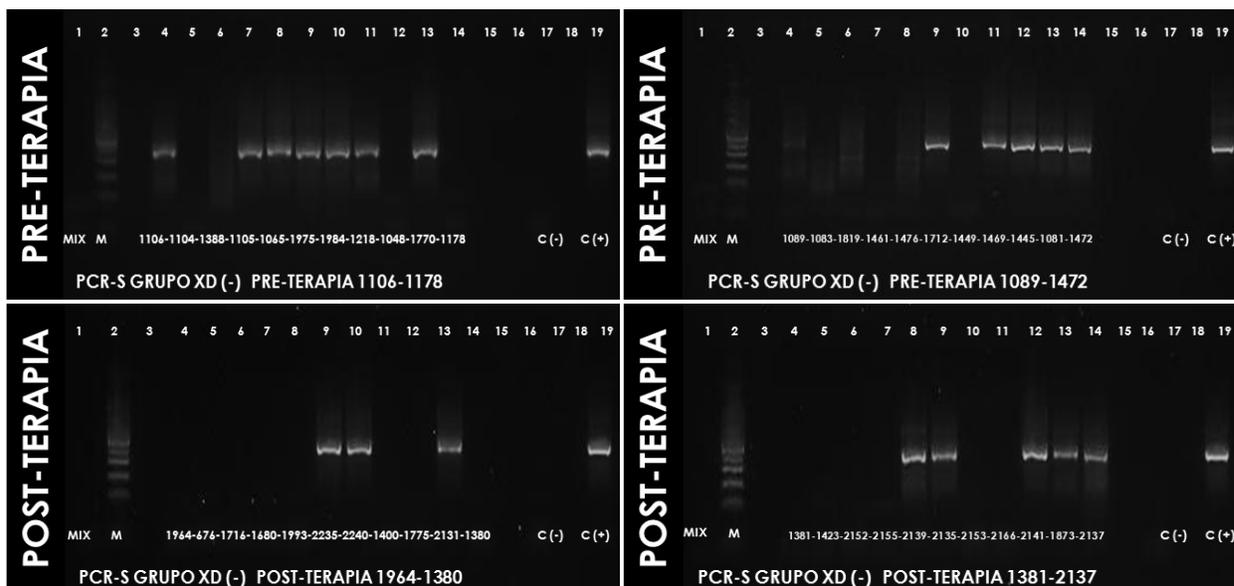


Tabla 11: Resumen de resultados de PCR-S pre y post-terapia grupo XD (-)

PRE-TERAPIA			POST-TERAPIA		
Nº CASO	PCR-S	Nº CASO	Seguimiento	PCR-S	Parasitemia
1106	+	1964	17 meses	-	Elimina
1104	-	1676	5 meses	-	No Evidencia
1388	-	1716	3 meses	-	No Evidencia
1105	+	1680	7 meses	-	Elimina
1065	+	1393	1 mes	-	Elimina
1975	+	2235	2 meses	+	Persiste
1984	+	2240	2 meses	+	Persiste
1218	+	1400	1 mes	-	Elimina
1048	-	1775	8 meses	-	No Evidencia
1770	+	2131	2 meses	+	Persiste
1178	-	1380	1 mes	-	No Evidencia
1089	+ leve	1381	1 mes	-	Elimina
1083	-	1423	1 mes	-	No Evidencia
1819	-	2152	1 mes	-	No Evidencia
1461	-	2155	2 meses	-	No Evidencia
1476	-	2139	1 mes	+	Aparece
1712	+	2135	1 mes	+	Persiste
1449	-	2153	1 mes	-	No Evidencia
1469	+	2166	1 mes	-	Elimina
1445	+	2141	1 mes	+	Persiste
1081	+	1873	12 meses	+	Persiste
1472	+	2137	2 meses	+	Persiste

2.2.4 Cuantificación de *T. cruzi* mediante qPCR y control X12

En todos los ensayos realizados, los parámetros de evaluación tanto de la curva estándar para la determinación de *T. cruzi*, como para la curva estándar de determinación de ADN humano mediante la secuencia X12, fueron óptimos, al igual que los controles de reacción considerados (Figuras 6, 7, 8, 9, 10 y 11).

Todas las muestras evaluadas mostraron amplificación para la secuencia X12 del ADN humano, por lo que se consideró que no hubo pérdidas de material genético durante el proceso de extracción de las muestras sanguíneas, descartando resultados falsos negativos. El análisis en condiciones de pre-terapia, evidenció parasitemia en 17 casos (77,27%). En 8 de los 22 pacientes (36,36%) la carga parasitaria es eliminada. En 14 muestras se mantiene la parasitemia posterior al tratamiento con NFX, lo que representa un 63,63% de persistencia de *T. cruzi* en sangre (36,36% con <1parásito/mL). De estos últimos pacientes, solo 1 (4,55%) muestra disminución de su carga parasitaria, comparada con su condición pre-terapia. En 4 casos (18,18%) aparece parasitemia, pese a que no evidenciaron parasitemia en qPCR pre-terapia. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 12.

Tabla 12: Resultados de qPCR para *T. cruzi* y control X12 del grupo XD (-)

N° CASO	PRE-TERAPIA qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12					N° CASO	Seguimiento	POST-TERAPIA qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12					Parasitemia
	<i>T. cruzi</i>	cT <i>T. cruzi</i>	Parásitos/mL	X12	cT X12			<i>T. cruzi</i>	cT <i>T. cruzi</i>	Parásitos/mL	X12	cT X12	
1106	+	39,93	<1	+	30,51	1964	17 meses	+	36,95	<1	+	28,91	Persiste
1104	+	36,76	<1	+	31,31	1676	5 meses	-	No Ct	0	+	29,48	Elimina
1388	+	36,31	<1	+	29,49	1716	3 meses	+	39,42	<1	+	29,67	Persiste
1105	+	36,37	<1	+	29,59	1680	7 meses	-	No Ct	0	+	29,02	Elimina
1065	+	21,08	9,599	+	33,14	1393	1 mes	+	36,04	<1	+	29,86	Disminuye
1975	+	38,12	<1	+	29,31	2235	2 meses	+	39,51	<1	+	29,79	Persiste
1984	+	35,01	<1	+	29,19	2240	2 meses	+	39,9	<1	+	28,93	Persiste
1218	+	35,62	<1	+	29,47	1400	1 mes	+	37,35	<1	+	28,92	Persiste
1048	-	No Ct	0	+	33,75	1775	8 meses	-	No Ct	0	+	30,5	No Evidencia
1770	-	No Ct	0	+	30,65	2131	2 meses	+	39,09	<1	+	29,91	Aparece
1178	+	35,63	<1	+	31,32	1380	1 mes	+	38,56	<1	+	29,49	Persiste
1089	+	33,56	2,1	+	29,72	1381	1 mes	+	31,85	6,49	+	29,54	Aumenta
1083	-	No Ct	0	+	33,73	1423	1 mes	+	37,86	<1	+	29,5	Aparece
1819	+	38,37	<1	+	29,94	2152	1 mes	-	No Ct	0	+	30,01	Elimina
1461	+	35,48	<1	+	28,50	2155	2 meses	-	No Ct	0	+	27,79	Elimina
1476	+	33,38	<1	+	28,84	2139	1 mes	-	No Ct	0	+	27,83	Elimina
1712	+	35,38	<1	+	28,58	2135	1 mes	-	No Ct	0	+	28,37	Elimina
1449	+	37,41	<1	+	30,53	2153	1 mes	-	No Ct	0	+	28,01	Elimina
1469	+	36,86	<1	+	28,25	2166	1 mes	+	38,98	<1	+	27,38	Persiste
1445	+	34,97	<1	+	30,26	2141	1 mes	+	37,94	<1	+	28,59	Persiste
1081	-	No Ct	0	+	28,04	1873	12 meses	+	39,38	<1	+	28,48	Aparece
1472	-	No Ct	0	+	26,28	2137	2 meses	+	34,67	<1	+	26,88	Aparece

Las Tablas 26 y 27 (anexo) resumen la evaluación de todos los pacientes con cada una de las técnicas parasitológicas.

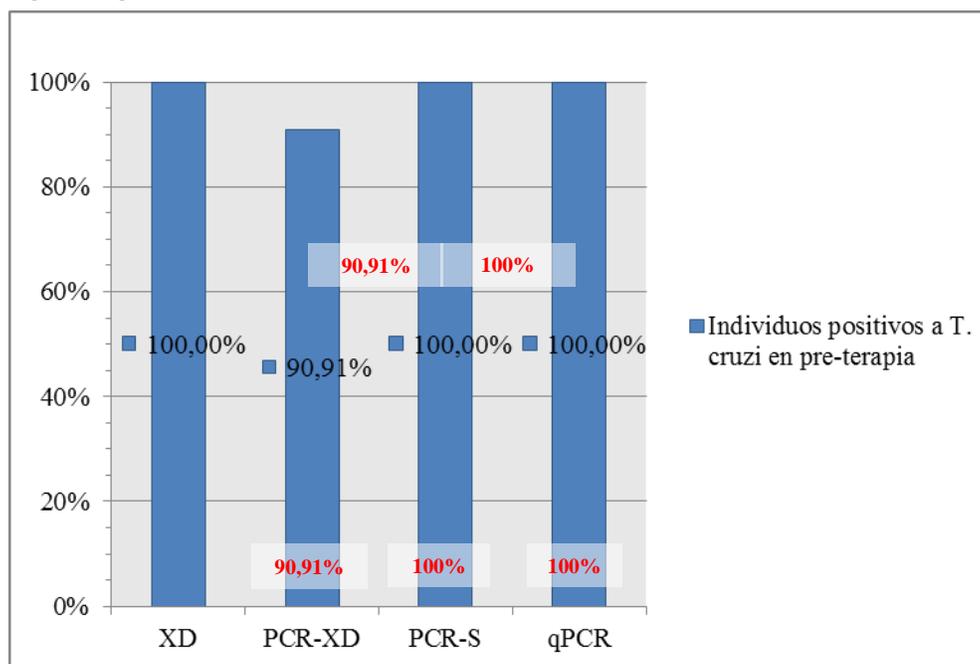
2.3 Análisis estadístico

2.3.1 Concordancia entre metodologías diagnósticas cualitativas dentro de grupos

Utilizando STATA SE v.11 e InfoStat/E, se comparó la proporción de pacientes de casos positivos a PCR-XD, PCR-S y qPCR respecto a XD tanto en pre como post-terapia. Además, se comparó las proporciones de casos positivos a PCR-XD/PCR-S y PCR-S/qPCR en igualdad de mediciones.

Para el grupo XD (+) en condiciones pre-terapia (gráfico 1 y tabla anexa), las metodologías de PCR-XD, PCR-S y qPCR presentó un 90,91, 100 y 100% de concordancia observada respecto a XD, respectivamente. Las diferencias entre las metodologías nombradas respecto a XD, no fueron significativas (Diferencias: 0,09; 0 y 0. Valores $p= 0,244186$; 1 y 1, respectivamente). La concordancia observada entre PCR-XD y PCR-S fue de un 90,9%, mientras que para PCR-S y qPCR fue de un 100%. Las diferencias entre las metodologías nombradas, no fueron significativas (Diferencias: -0,09 y 0. Valores $p= 0,244186$ y 1, respectivamente).

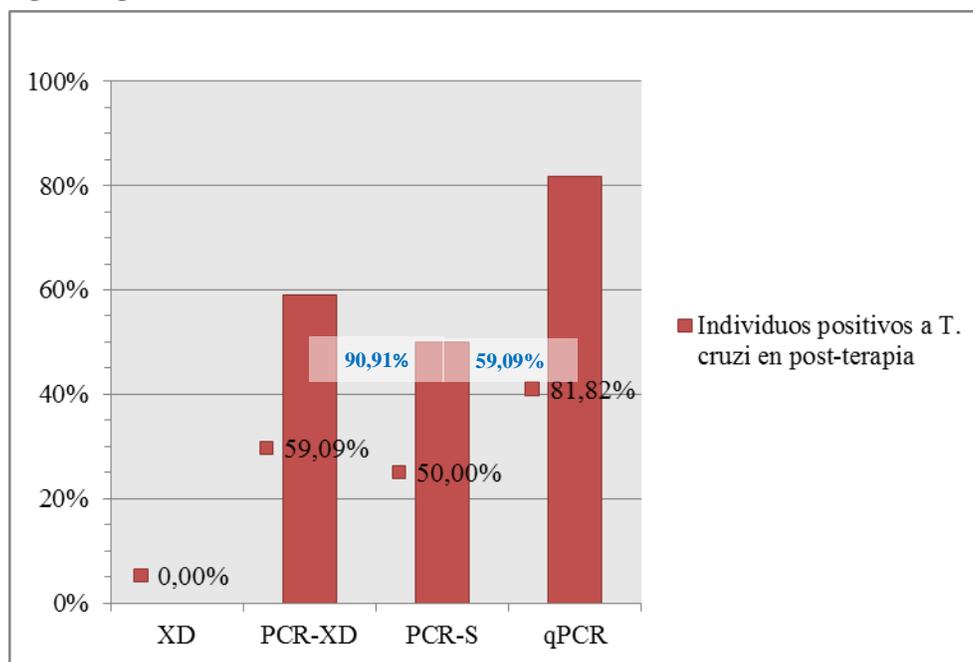
Gráfico 1: Porcentaje de individuos del grupo XD (+) positivos a *T. cruzi* en pre-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica



GRUPO XD (+) PRE-TERAPIA							
	PCR-XD	PCR-S	qPCR		PCR-S	PCR-S	qPCR
XD	0,09 (valor p= 0,244186)	0 (valor p= 1)	0 (valor p= 1)	PCR-XD	-0,09 (valor p= 0,244186)	PCR-S	0 (valor p= 1)

Para el mismo grupo en condiciones post-terapia (Gráfico 2 y Tabla anexa), no existe concordancia entre las metodologías de diagnóstico molecular, respecto a XD. Las diferencias entre PCR-XD, PCR-S y qPCR respecto a XD, fueron significativas (Diferencias: -0,590909; -0,500000 y -0,818182. Valores p= 0,000010; 0,000092 y 0,000000, respectivamente). La concordancia observada entre PCR-XD y PCR-S fue de un 90,91%, mientras que para PCR-S y qPCR fue de 59,09%. No hubo diferencias significativas entre PCR-XD y PCR-S, no obstante, si existen diferencias significativas entre los porcentajes de individuos positivos a *T. cruzi* detectados mediante PCR-S y qPCR (Diferencias: 0,090909 y -0,318182. Valores p= 0,563299 y 0,032169, respectivamente).

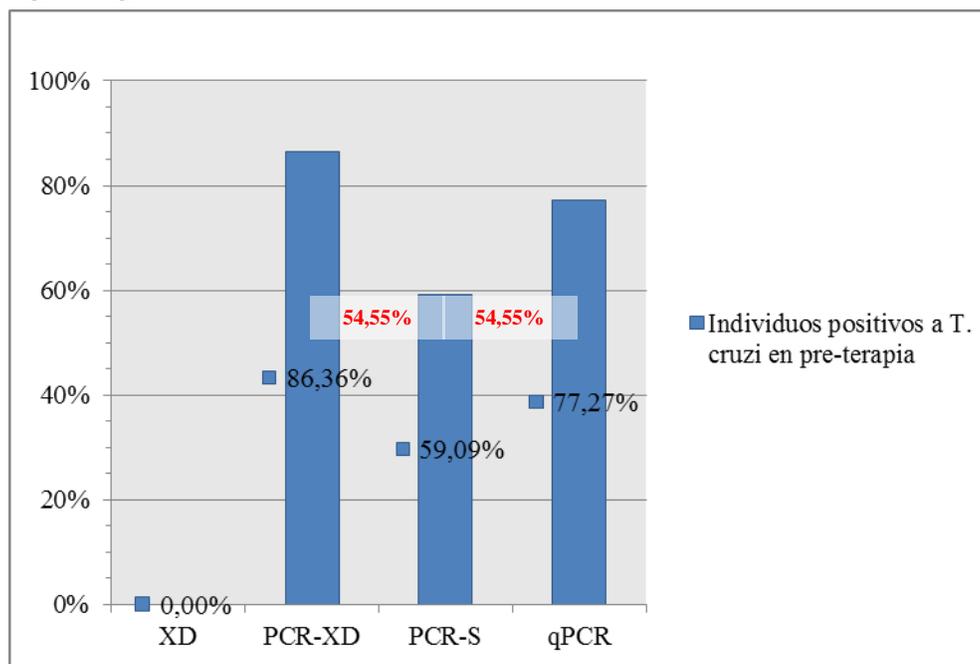
Gráfico 2: Porcentaje de individuos del grupo XD (+) positivos a *T. cruzi* en post-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica



GRUPO XD (+) POST-TERAPIA							
	PCR-XD	PCR-S	qPCR	PCR-XD	PCR-S	PCR-S	qPCR
XD	-0,590909 (valor p= 0,000010)	-0,5 (valor p= 0,000092)	-0,818182 (valor p= 0,000000)		0,090909 (valor p= 0,563299)		-0,318182 (valor p= 0,032169)

Para el grupo XD (-) en condiciones pre-terapia (Gráfico 3 y Tabla anexa), no existe concordancia entre las metodologías de diagnóstico molecular, respecto a XD. Las diferencias entre las metodologías nombradas respecto a XD, son significativas (Diferencias: -0,863636; -0,590909 y -0,772727. Valores p= 0,000000; 0,000010 y 0,000000, respectivamente). La concordancia observada entre PCR-XD y PCR-S fue de un 54,55%, misma concordancia observada entre PCR-S y qPCR. Las diferencias entre las metodologías nombradas fueron no fueron significativas (Diferencias: 0,272727 y -0,181818. Valores p= 0,052019 y 0,217940, respectivamente).

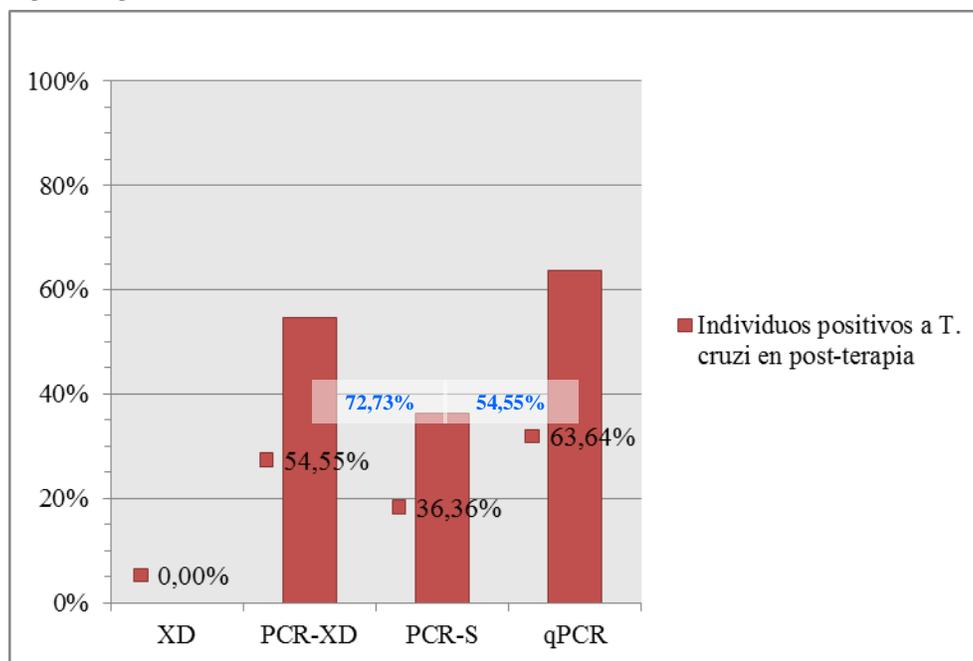
Gráfico 3: Porcentaje de individuos del grupo XD (-) positivos a *T. cruzi* en pre-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica



GRUPO XD (-) PRE-TERAPIA							
	PCR-XD	PCR-S	qPCR	PCR-XD	PCR-S	PCR-S	qPCR
XD	-0,863636 (valor p= 0,000000)	-0,590909 (valor p= 0,000010)	-0,772727 (valor p= 0,000000)		0,272727 (valor p= 0,052019)		-0,181818 (valor p= 0,217940)

Para el grupo XD (-) en condiciones post-terapia (Gráfico 4 y Tabla anexa), no existe concordancia entre las metodologías de diagnóstico molecular, respecto a XD. Las diferencias entre PCR-XD, PCR-S y qPCR respecto a XD, fueron significativas (Diferencias: -0,545455; -0,363636 y -0,636364. Valores p= 0,000031; 0,001804 y 0,000003, respectivamente). La concordancia observada entre las proporciones de positivos a *T. cruzi* detectados mediante PCR-XD y PCR-S fue de un 72,73%, mientras que para PCR-S y qPCR fue de 54,55%. No hubo diferencias significativas entre PCR-XD y PCR-S ni tampoco entre PCR-S y qPCR (Diferencias: 0,1818 y -0,272727. Valores p= 0,246626 y 0,082247, respectivamente).

Gráfico 4: Porcentaje de individuos del grupo XD (-) positivos a *T. cruzi* en post-terapia, según técnica parasitológica diagnóstica



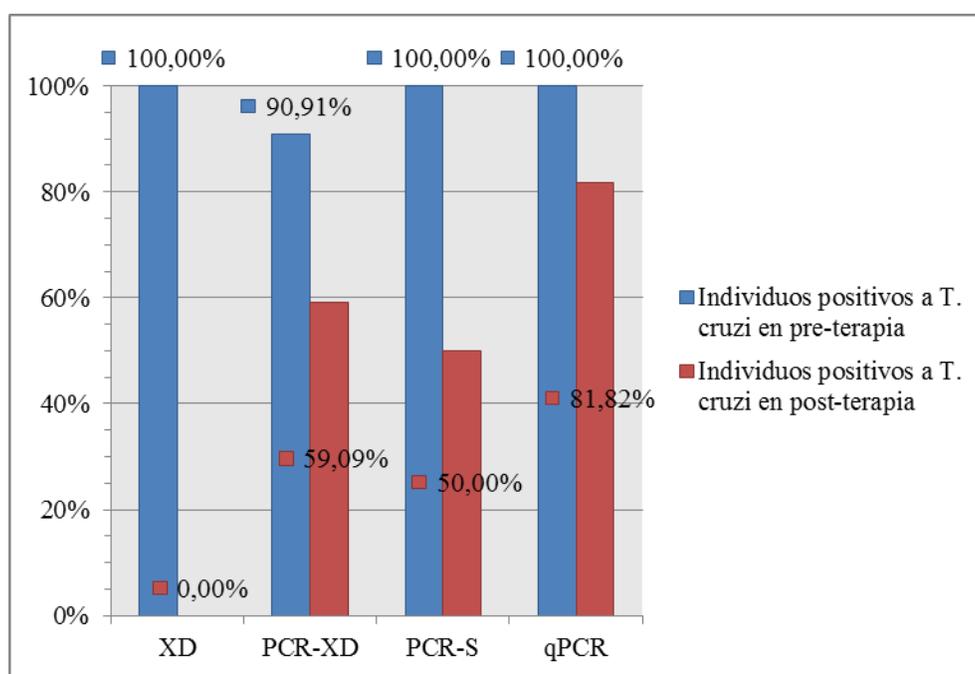
GRUPO XD (-) POST-TERAPIA						
	PCR-XD	PCR-S	qPCR	PCR-XD	PCR-S	qPCR
XD	-0,545455 (valor p= 0,000031)	-0,363636 (valor p= 0,001804)	-0,636364 (valor p= 0,000003)	0,1818 (valor p= 0,246626)	-0,272727 (valor p= 0,082247)	

2.3.2 Comparaciones entre metodologías diagnósticas cualitativas pre y post-terapia

Con el fin de determinar diferencias entre las proporciones de casos positivos obtenidas tanto en pre como post-terapia, se realizó el test no paramétrico de McNemar basado en la distribución de χ^2 con un nivel de significación de 0,05, para cada una de las pruebas parasitológicas cualitativas aplicadas, considerando además los resultados obtenidos a tiempo final en la qPCR.

Para el grupo XD (+) (Gráfico 5 y Tabla anexa), existen diferencias significativas pre y post-terapia entre el XD, PCR-XD y PCR-S (Diferencias: 1; 0,318182, 0,500000. Valores p= 0,0000; 0,0156; 0,0010; respectivamente). No obstante, no existen diferencias significativas entre el qPCR pre y post-terapia (Diferencia: 0,1818, Valores p= 0,1250).

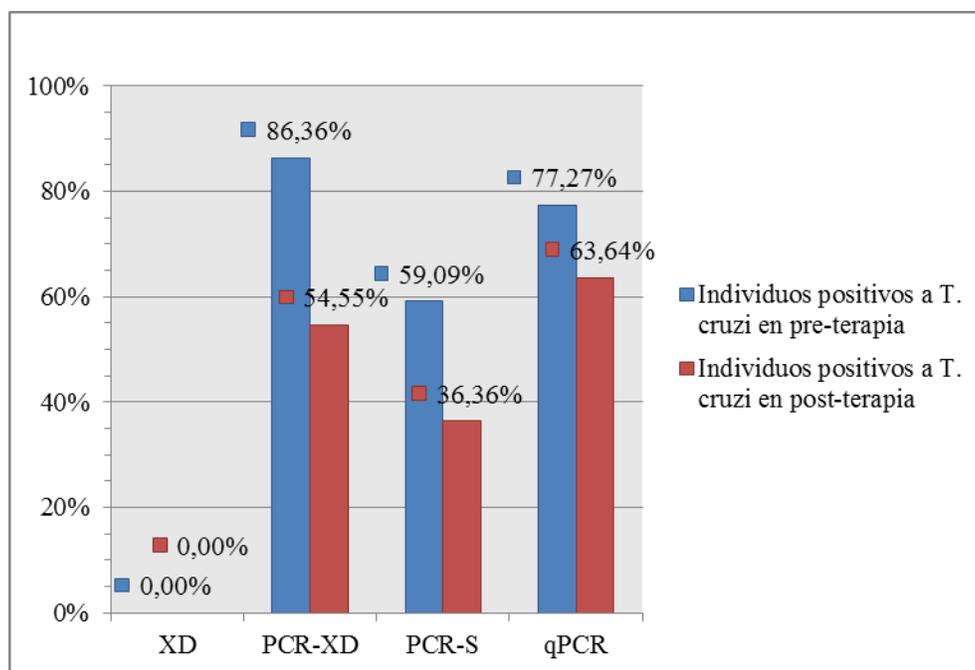
Gráfico 5: Porcentaje de individuos del grupo XD (+) positivos a *T. cruzi*, según técnica parasitológica diagnóstica y momento de evaluación



DIFERENCIA DE PROPORCIONES GRUPO XD (+) PRE-TERAPIA/POST-TERAPIA							
	XD	PCR-XD	PCR-S	PCR-S	qPCR	qPCR	
XD	1 (valor p= 0,0000)	PCR-XD	0,318182 (valor p= 0,0156)	PCR-S	0,500000 (valor p= 0,0010)	qPCR	0,1818 (valor p= 0,1250)

Para el grupo XD (-) (Gráfico 6 y Tabla anexa), no existen diferencias significativas pre y post-terapia entre el XD, PCR-S y qPCR (Diferencias: 0; 0,227273, 0,136364. Valores p= 1,0000; 0,1250; 0,5488; respectivamente). Solamente existen diferencias significativas entre el PCR-XD pre y post-terapia (Diferencia: 0,3081, Valores p= 0,0391).

Gráfico 6: Porcentaje de individuos del grupo XD (-) positivos a *T. cruzi*, según técnica parasitológica diagnóstica y momento de evaluación



DIFERENCIA DE PROPORCIONES GRUPO XD (-) PRE-TERAPIA/POST-TERAPIA							
	XD	PCR-XD	PCR-S	qPCR			
XD	0 (valor p= 1,0000)	PCR-XD	0,03181 (valor p= 0,0391)	PCR-S	0,227273 (valor p= 0,1250)	qPCR	0,136364 (valor p= 0,5488)

Las Tablas 15, 16, 17, 18, 19 y 20 muestran la distribución de individuos según su condición parasitológica dada por una misma metodología diagnóstica antes y después del tratamiento con NFX.

Tabla 13: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (+), según condición parasitológica al PCR-XD pre y post-terapia con Nifurtimox.

		Grupo XD (+) PCR-XD Post-terapia		
		Positivos	Negativos	Total
Grupo XD (+) PCR-XD Pre-terapia	Positivos	13	7	20
	Negativos	0	2	2
		13	9	22

Tabla 14: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (-), según condición parasitológica al PCR-XD pre y post-terapia con Nifurtimox.

		Grupo XD (-) PCR-XD Post-terapia		
		Positivos	Negativos	Total
Grupo XD (-) PCR-XD Pre-terapia	Positivos	11	8	19
	Negativos	1	2	3
		12	10	22

Tabla 15: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (+), según condición parasitológica al PCR-S pre y post-terapia con Nifurtimox.

		Grupo XD (+) PCR-S Post-terapia		
		Positivos	Negativos	Total
Grupo XD (+) PCR-S Pre-terapia	Positivos	11	11	22
	Negativos	0	0	0
		11	11	22

Tabla 16: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (-), según condición parasitológica al PCR-S pre y post-terapia con Nifurtimox.

		Grupo XD (-) PCR-S Post-terapia		
		Positivos	Negativos	Total
Grupo XD (-) PCR-S Pre-terapia	Positivos	7	6	13
	Negativos	1	8	9
		8	14	22

Tabla 17: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (+), según condición parasitológica al qPCR pre y post-terapia con Nifurtimox.

		Grupo XD (+) qPCR Post-terapia		
		Positivos	Negativos	Total
Grupo XD (+) qPCR Pre-terapia	Positivos	18	4	22
	Negativos	0	0	0
		18	4	22

Tabla 18: Tabla de contingencia de individuos pertenecientes al grupo XD (-), según condición parasitológica al qPCR pre y post-terapia con Nifurtimox.

		Grupo XD (-) qPCR Post-terapia		
		Positivos	Negativos	Total
Grupo XD (-) qPCR Pre-terapia	Positivos	10	7	17
	Negativos	4	1	5
		14	8	22

2.3.3 Comparaciones entre pruebas parasitológicas cuantitativas

Ninguno de los grupos evaluados poseía distribución normal para la variable parásitos/mL (test de Shapiro-Wilk, grupo XD (+) y XD (-) valores $p= 0,00002$ y $0,00003$, respectivamente). De igual forma, el test de Leneve determinó que no existía homocedasticidad entre ambos grupos (valor $p= 0,00001$). Debido a esto, no fue posible realizar un test estadístico paramétrico dirigido a determinar diferencias entre los promedios de las muestras de ambos grupos, para la variable parásitos/mL. De igual forma, no fue posible realizar esta misma comparación en cada grupo respecto a la condición pre y post-terapia.

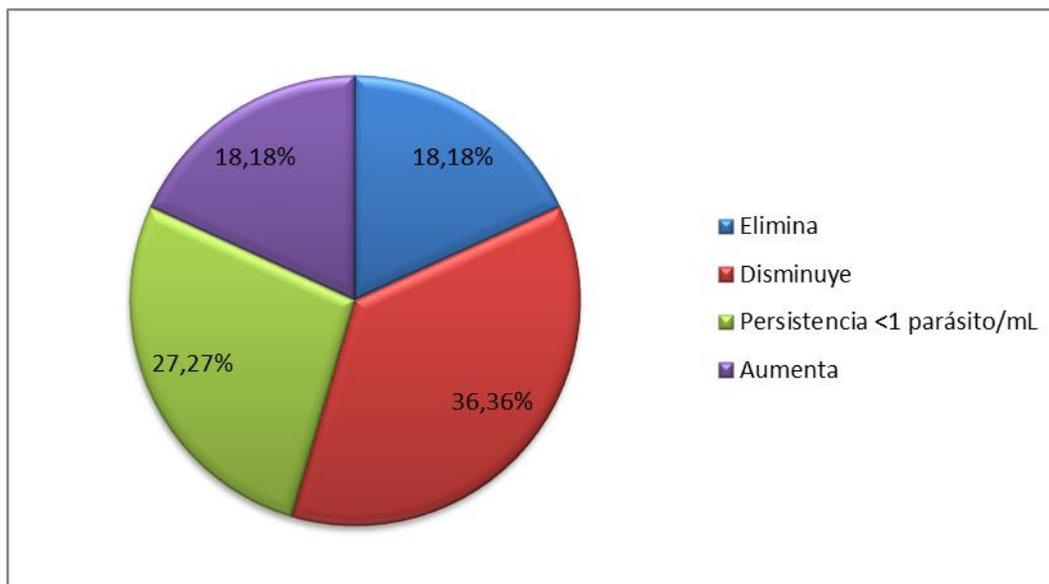
La aplicación de un test no paramétrico tampoco fue factible, dado que, si bien para realizar este tipo de test no se requiere demostrar distribución normal entre los grupos comparados, si es necesario el análisis de datos cuantitativos, ya sean discretos o continuos.

Muchos casos obtenidos fueron cuantificados con parasitemias <1 parásito/mL, no siendo posible determinar su valor preciso de cuantificación, puesto que eran observaciones que se escapaban del rango de cuantificación determinado en la curva estándar de qPCR. No obstante, se reunió los datos en series agrupadas con el fin de evaluar la factibilidad de

comparar la mediana de cada grupo, tanto pre como post-terapia. Lamentablemente, la distribución de datos no resultó representativa de la condición previa al proceso de categorización. En consecuencia, los datos obtenidos mediante qPCR, fueron analizados en forma descriptiva.

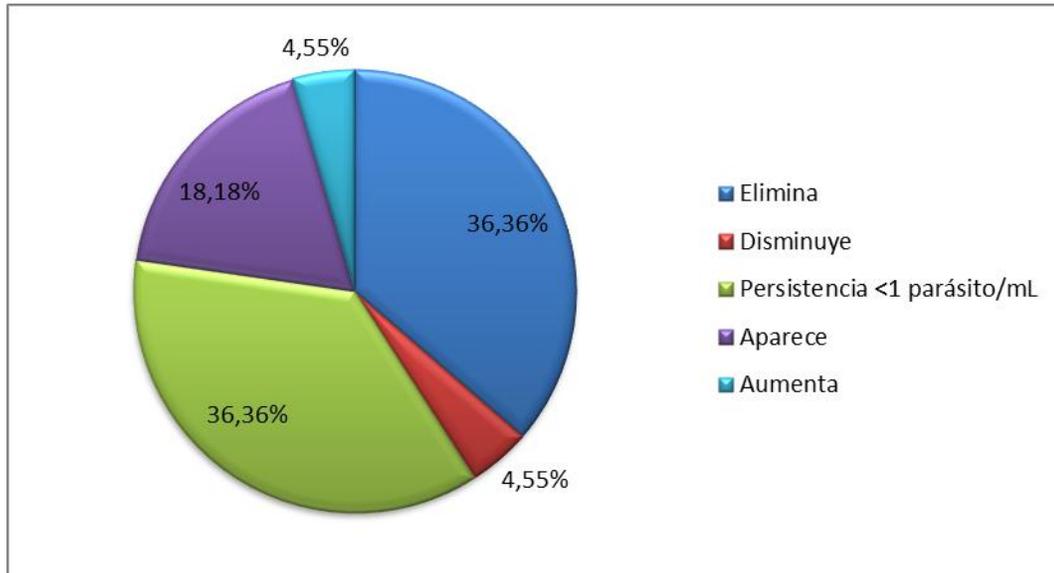
En el caso del grupo XD (+), el 100 % de ellos evidenció parasitemia en la pre-terapia mediante qPCR. Luego del tratamiento con NFX, el 18,18% de los pacientes elimina al parásito al momento de la medición; en 36,36% de los pacientes la parasitemia disminuye; en un 18,18% aumenta y en 27,27 % de los casos se mantiene. Ésta persistencia es detectable, pero incuantificable y menor a 1 parásito/mL, bajo el sistema qPCR estandarizado (Gráfico 7).

Gráfico 7: Condición de individuos pertenecientes al grupo XD (+) evaluados en post-terapia mediante qPCR, según situación de parasitemia.



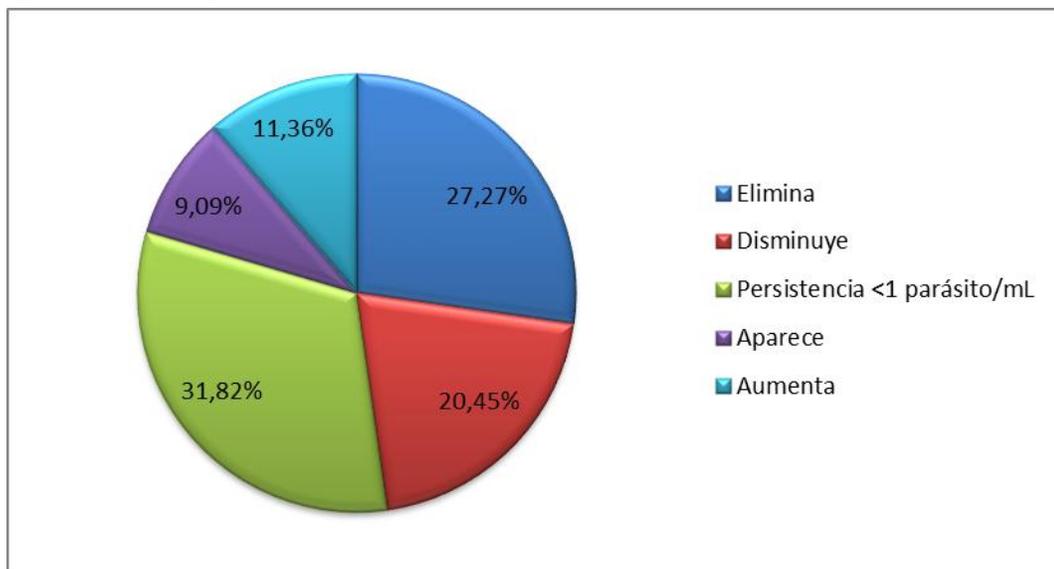
En el caso del grupo XD (-), el 77,27 % de ellos evidenció parasitemia en la pre-terapia mediante qPCR. Luego del tratamiento con NFX, el 36,36% de los pacientes elimina al parásito al momento de la medición; en 4,55% de los pacientes la parasitemia disminuye; en un 18,18% aparece; en un 4,55% aumenta y en un 36,36 % de los casos persiste (detectable pero <1 parásito/mL) (Gráfico 8).

Gráfico 8: Condición de individuos pertenecientes al grupo XD (-) evaluados en post-terapia mediante qPCR, según situación de parasitemia.



Considerando a la totalidad de los individuos tratados, el 88,63 % de ellos evidenció parasitemia en la pre-terapia mediante qPCR. Luego del tratamiento con NFX, el 27,27% de los pacientes elimina al parásito al momento de la medición; en 20,45% de los pacientes la parasitemia disminuye; en un 9,09% aparece; en un 11,36% aumenta y en un 31,82 % de los casos persiste (detectable pero <1 parásito/mL) (Gráfico 9).

Gráfico 9: Condición de individuos pertenecientes a ambos grupos evaluados en post-terapia mediante qPCR, según situación de parasitemia.



VIII. DISCUSIÓN

1. Estandarización de la reacción de qPCR para la cuantificación de *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica

El proceso de cuantificación mediante qPCR considera como condición *sine qua non*, la generación de una curva estándar cuando éste proceso implica una cuantificación absoluta y no relativa. Un punto crítico de ésta etapa, es la correcta obtención del primer estándar de cuantificación, puesto que a partir de éste se generarán mediante diluciones seriadas los siguientes estándares de cuantificación. Resulta insuficiente la información disponible en bibliografía para el proceso de generación de una curva estándar de *T. cruzi*. Por lo general, los autores dan por hecho cómo se genera la curva estándar de cuantificación mediante qPCR, haciendo dificultosa la tarea para aquellos investigadores que desean implementar por vez primera la técnica en sus respectivos laboratorios. Cummings y Tarleton en el año 2003, fueron pioneros en instaurar la estrategia de qPCR, mediante el método de detección SYBR® Green, para la cuantificación de *T. cruzi* en tejido de ratones inoculados experimentalmente. No obstante, en este estudio no existe claridad sobre cómo se determinó el número inicial de formas epimastigotas de *T. cruzi* para la generación de los estándares de cuantificación. En el año 2007, Piron y col., desarrollaron la estrategia de qPCR mediante la utilización del sistema de detección TaqMan®, contribuyendo con las secuencias de partidores y sonda que son ampliamente utilizados en la actualidad para la determinación de la carga parasitaria dada por *T. cruzi*. Al igual que esta tesis, el trabajo realizado por Piron se inició con un estándar inicial de 1×10^6 parásitos/mL. De igual forma, se descartaron los estándares que no fueran necesarios, o bien que no fueran óptimos para la cuantificación de *T. cruzi*, determinando un rango dinámico de detección entre 1×10^5 y 1×10^1 parásitos/mL. Si bien, este estudio habla de la generación de diluciones seriadas de formas epimastigotas de *T. cruzi*, no es claro en la metodología para la determinación del número de parásitos utilizados en el estándar inicial. En el año 2009, Duffy y col. lograron establecer una curva estándar con un rango de cuantificación entre 1×10^5 y 1×10^{-2} parásitos/mL. No obstante, la metodología de detección para qPCR utilizada en esta publicación se basa en la estrategia de SYBR® Green, conocida por su alta sensibilidad pero menor especificidad. Al igual que otros autores, este estudio no es

claro en la metodología para la obtención del primer estándar de cuantificación. Hidron y col. en el año 2010, en Santa Cruz, Bolivia, evaluaron pacientes con ECh y con cardiomiopatía, a partir de coágulos de origen sanguíneo como muestra biológica a evaluar. Entre las técnicas utilizadas para la evaluación de dichos pacientes, se consideró el uso de qPCR en base a la metodología de detección TaqMan®. El autor utilizó los mismos partidores utilizados en esta tesis, junto a un sistema de control interno comercial basado en la detección de ARNasa P humana. Al igual que otros autores, Hidron y col. realizaron diluciones seriadas a partir de 1×10^6 parásitos, con la diferencia de que estos fueron inoculados, según lo descrito, en un coágulo sanguíneo. De igual forma, el autor no detalla cómo fue determinada la concentración inicial de parásitos necesarios para generar la curva estándar de cuantificación de *T. cruzi*. El límite de detección, al igual que en esta tesis, fue de 1×10^0 parásitos/mL. Schijman y col. en el año 2011 realizaron un estudio de carácter internacional el cual incluyó 26 laboratorios de América y Europa, con el objetivo de evaluar distintas metodologías de PCR y qPCR para la detección de *T. cruzi* en muestras sanguíneas de pacientes con ECh, en orden de seleccionar las metodologías con mejor rendimiento para una validación internacional. Se trabajó con 3 grupos de muestras distintas, las cuales variaban en su metodología de procesamiento. Por ser un estudio que consideró distintos laboratorios internacionales, no existía uniformidad en la técnica de qPCR. De los laboratorios que disponían del ensayo, no existen detalles de la preparación de la curva de estandarización para la cuantificación de qPCR, por lo que no se tiene claridad sobre cómo se determinó la concentración inicial de parásitos. Cencig y col. en el año 2011, determinaron la carga parasitaria en tejidos de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados medicamente con Ambisome. La generación de cada uno de los estándares de *T. cruzi* se realizó de la misma forma descrita por Cummings y Tarleton en el año 2003, por lo cual se desconoce el protocolo de determinación de la concentración inicial de *T. cruzi* para la generación de la curva estándar de cuantificación.

Dada la experiencia obtenida en el Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico de la Universidad de Chile por la participación en distintos grupos de trabajo de carácter internacional, la evaluación de la carga parasitaria de *T. cruzi* en pacientes con ECh, considera el uso de la cámara de Neubauer para estimar la concentración parasitaria inicial del primer estándar de cuantificación (por lo general, un millón de formas parasitarias, 1×10^6

parásitos/mL). Esta técnica tiene como ventaja, la visualización y determinación de las formas epimastigotas de *T. cruzi*, toda vez que entrega información en relación a la concentración de parásitos/mL presentes en una muestra obtenida de cultivo axénico y evaluación de su viabilidad. No obstante, los resultados obtenidos en este estudio evidencian que el número de formas parasitarias determinadas mediante esta última técnica puede variar notablemente dependiendo de la concentración de la muestra de cultivo parasitario evaluado, de la homogenización del mismo y del personal técnico que realice el recuento, entre otras razones. En este estudio, el número de parásitos determinado mediante cámara de Neubauer fue de $8,9 \times 10^6$ parásitos/mL. No obstante, luego del proceso de extracción y purificación de ADN presente en el eluido de 100 μ L y la posterior cuantificación de ADN parasitario total utilizando el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene y kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit, se determinó que la cantidad de ADN presente luego del proceso de extracción fue de 10,09 ng/ μ L, lo que equivale a $5,045 \times 10^6$ parásitos en los 100 μ L de purificado. Estos resultados sugieren que existe gran pérdida de ADN durante el procesamiento de los estándares parasitarios, incluyendo la etapa de extracción y purificación. Para este caso, la variación de ADN fue de un 56,7% respecto a lo calculado mediante cámara de Neubauer. Estos cálculos fueron realizados según la información aportada por Kooy y col. (1989), Ferrer y col. (2008) y Duffy y col. (2009), que señalan que cada célula de *T. cruzi* posee 200 fg de ADN. Con esta información y la obtenida a partir de la cuantificación mediante fluorometría con el equipo Mx3000P™, se construyó una curva estándar de cuantificación para qPCR a partir de ADN equivalente a 1×10^6 parásitos/mL, metodología que es más precisa en comparación a la forma tradicional mediante cámara de Neubauer, descrita en la mayoría de los artículos publicados y relacionados con el tema.

El análisis de las curvas estándar de qPCR permitió detectar pérdida de reproducibilidad en los últimos puntos de dilución (ADN parasitario equivalente a 1×10^{-1} parásitos/mL a ADN equivalente a 1×10^{-3} parásitos/mL), pese a las precauciones tomadas al realizar las diluciones y al cargar los puntos de la dilución en los tubos de reacción. Debido a ello, se decidió disminuir el rango dinámico de detección de ADN de *T. cruzi* desde ADN equivalente a 1×10^5 a 1×10^0 parásitos/mL. Cabe destacar la importancia de este rango de cuantificación, dado que se deben determinar parasitemias en individuos con ECh crónica, las

que resultan bajas y fluctuantes, escapando muchas veces al del rango de cuantificación. En este estudio, fue posible determinar como límite de cuantificación mínimo una parasitemia equivalente 1 parásito/mL. Cabe mencionar que existieron casos que fueron igualmente pesquisados mediante qPCR aunque su parasitemia fuera <1 parásito/mL.

La determinación de la especificidad y la sensibilidad en la detección de ADN parasitario representan un aspecto esencial en la estandarización de la técnica de qPCR para la cuantificación de la carga parasitaria dada por *T. cruzi* en muestras de sangre periférica obtenidas de pacientes con ECh crónica, especialmente considerando la metodología basada en el uso de sondas específicas de tipo TaqMan® (Duffy *et al.*, 2009; Schijman *et al.*, 2011 Qvarnstrom *et al.*, 2012). En el estudio realizado por Qvarnstrom y col. en el año 2012, la validación de un ensayo de qPCR dirigido a la detección de *T. cruzi* mediante el mismo sistema de partidores y sonda TaqMan® publicadas por Piron en el año 2007 y que también fueron utilizados en esta tesis, determinó una sensibilidad y especificidad diagnóstica de un 63% y 100%, respectivamente. El ensayo de qPCR estandarizado en esta tesis arrojó la misma especificidad citada con anterioridad. No obstante, la sensibilidad del ensayo de qPCR de esta tesis es superior (92% comparado con un 63%).

Por otra parte, en esta tesis se aplicó un sistema control interno basado en parte de la secuencia que codifica para X12 de origen humano. Previamente, Bravo y col. en el año 2012 establecieron este CIE basado en el sistema de detección SYBR® Green aplicado para la evaluación de purificados de deyecciones de vinchucas de XD mediante qPCR. En esta tesis, se generó la sonda TaqMan® N3NX12, compatible con los partidores N1X12 y N2X12 publicados, generando un sistema CIE TaqMan® compatible con el perfil térmico de reacción de qPCR para la detección de *T. cruzi* y que, de esta forma, permite descartar resultados falsos negativos producto de ausencia de ADN en la reacción. Esto último es de real importancia a la hora de evaluar el éxito del tratamiento antichagásico.

El objetivo de estandarizar la técnica de qPCR en muestras de sangre periférica para la cuantificación de *T. cruzi* circulante en pacientes con ECh crónica se cumplió en conformidad.

2. Condición parasitológica evaluada mediante qPCR de pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.

El criterio aplicado para la conformación de ambos grupos de individuos evaluados (Grupo XD (+) y Grupo XD (-)) tuvo como fin revelar diferencias en la concordancia de las metodologías diagnósticas parasitológicas actualmente disponibles para la ECh crónica en el Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico, cuando la parasitemia sea o no evidente mediante el examen microscópico de deyecciones de triatomos obtenidas a partir de XD, dado que esta es prueba fiel de la presencia de *T. cruzi* en el hospedero cuando el resultado es positivo.

En la condición pre-terapia, cuando la parasitemia es evidente (Grupo XD (+)) existe plena concordancia entre las metodologías diagnósticas comparadas. Cuando existió diferencia, éstas resultaron ser bajas (9%) e insignificantes (valor $p=0,244186$). Una explicación para la diferencia entre XD y PCR-XD se justifica, dado que la muestra evaluada mediante microscopia no es exactamente la misma que se evalúa posteriormente mediante PCR-XD (ésta última es un pool de deyecciones de XD obtenida a los 30, 60 y 90 días). Cuando la parasitemia no es evidente (grupo XD (-)), existen notables diferencias entre las metodologías diagnósticas moleculares con respecto a XD. Este último, por si solo, constituye una herramienta que puede inducir a error al momento de evaluar la condición parasitaria de un individuo tratado, pese a la capacidad biológica de multiplicación de *T. cruzi* en el vector biológico. Zulantay y col. (2011), establecieron la importancia de la aplicación de la técnica de PCR-XD, ya que ésta tiene alta concordancia con XD, pero evidencia mayor sensibilidad. Esta situación coincide con los resultados de esta tesis, en especial cuando se analizan los resultados provenientes de individuos con parasitemias no evidentes, donde es posible detectar mediante PCR-XD a *T. cruzi* en el 86% de ellos. Al igual que el estudio de Zulantay y cols., en esta tesis no hubo diferencias significativas entre PCR-XD y PCR-S. En condiciones pre-terapia con NFX, las herramientas de diagnóstico molecular muestran alta sensibilidad, las diferencias que existieron entre ellas no fueron significativas en la detección de *T. cruzi*. Luego de aplicado el tratamiento con NFX, XD no tiene la capacidad de detectar a *T. cruzi*, independiente del nivel de parasitemia existente en condiciones de pre-terapia.

Consistentemente, PCR evidencia su utilidad cuando es aplicado en muestras de deyecciones provenientes de triatominos de XD, aumentando el nivel de detección del parásito. Esta condición se repite con las otras metodologías diagnósticas (PCR-S y qPCR). Un aspecto importante a destacar, es la alta capacidad de qPCR para detectar a *T. cruzi*, tanto en pre como post-terapia (al menos un 63,64% de detección en el caso del grupo XD (-) post-terapia), lo que evidencia su mayor sensibilidad.

En la actualidad, no existe un criterio de curación fidedigno para la etapa crónica de la ECh, ya que la serología, aunque decreciente en algunos casos tratados descritos en literatura, puede persistir positiva por más de 20 años. No obstante, los pacientes no presentan parásitos con las técnicas actualmente en uso: XD, hemocultivo, PCR y qPCR (Apt, 2011). El establecimiento de un criterio de cura de consenso constituye uno de los más grandes desafíos en la evaluación de la eficacia quimioterapéutica en la ECh crónica (Apt y Zulantay, 2011; Britto, 2009). Este criterio debe ser fiel reflejo del estatus parasitológico del paciente, particularmente en lo que a su parasitemia se refiere. Las metodologías serológicas, XD y en especial PCR-XD y PCR-S, son de utilidad para hacer el diagnóstico de ECh. No obstante, como ya se mencionó, los resultados de ELISA e IFI pueden seguir siendo positivos durante varios años post-tratamiento. Por otra parte, en sus bases de fundamento y aplicación, XD y PCR-XD/PCR-S representan sistemas de amplificación, ya sea para el parásito *in situ* (XD), o bien para su material genético (PCR). Sin duda, estas características son de relevancia para el diagnóstico de ECh, en especial en individuos crónicos, por la baja y fluctuante parasitemia existente en éstos. No obstante, al realizar amplificación de *T. cruzi*, en especial en condiciones post-terapia, no reflejan cuantitativamente la carga parasitaria real en el paciente tratado. Esta situación se ve reflejada en los resultados de esta tesis, donde se alcanza al menos un 50 y 36,36 % de detección de *T. cruzi* mediante técnicas moleculares convencionales en los grupos XD (+) y XD (-), respectivamente, lo que puede representar un resultado desalentador en este estudio, pese a que la comparación pre y post-terapia pueda dar cuenta de diferencias significativas entre las proporciones de individuos positivos a *T. cruzi* (esta situación ocurre en el grupo con parasitemia evidente, no así en el grupo en que la parasitemia no lo es). Sin embargo, dado que estas metodologías no representan la condición real del paciente al momento de ser evaluado, el criterio de cura fidedigno debe basarse en el nivel real y actual de

parasitemia y no meramente en su constatación, ya que ésta puede ser sobrevalorada al utilizar técnicas que impliquen la amplificación biológica y/o molecular de *T. cruzi*.

La aplicación de qPCR para el diagnóstico y evaluación de los niveles de parasitemia de pacientes con ECh crónica representa una situación ideal, pese a su difícil estandarización y mayor costo.

En general, qPCR muestra mayor sensibilidad diagnóstica comparada con las metodologías diagnósticas convencionales. En términos cualitativos, para ambos grupos qPCR determina que no existen diferencias entre las proporciones de individuos positivos a *T. cruzi* en pre y post-terapia. Sin embargo, este análisis prematuro no evidencia la realidad de cada paciente en lo que respecta a su nivel de parasitemia. La metodología de qPCR, a diferencia de los métodos diagnósticos convencionales para ECh, permite determinar la cantidad de material genético inicial perteneciente a *T. cruzi* presente en un individuo al momento de su evaluación, desestimando los procesos de amplificación biológica y química propios de las otras metodologías utilizadas.

Los resultados cuantitativos de qPCR evidencian la eliminación de *T. cruzi* en un 18,18 y 36,36% en los individuos con parasitemia evidente y no evidente, respectivamente. Lo más relevante recae en el hecho de que con el uso de NFX se logra una importante eliminación, disminución, o bien, una baja en la persistencia de *T. cruzi* circulante en los pacientes evaluados, evidenciando parasitemias <1 parásito/mL o incluso cero. El 86,36% del total de individuos evaluados eliminó o bien posee parasitemias detectables pero incuantificables (incluyendo los casos en que disminuye o aparece parasitemia luego del tratamiento con NFX, pero esta sigue siendo <1 parásito/mL), destacando los casos pre-terapia números 1478 y 1065, ambos con elevadas parasitemias y que luego del tratamiento evidenciaron una disminución radical. Exceptuando estos casos y en términos generales, es posible confirmar la información presente en la literatura, la cual menciona como característica la baja parasitemia presente en individuos con ECh crónica. En cinco casos (11,36%), la parasitemia aumentó levemente, mientras que en 4 casos (9,09%) esta aparece respecto a la condición pre-terapia. Esto puede ser indicador de destrucción celular en el hospedero, con la consecuente liberación de ADN de *T. cruzi* al torrente sanguíneo, de presencia de enfermedades concomitantes, o

bien, presencia de determinados linajes de *T. cruzi* resistentes a NFX que se ven favorecidos en su desarrollo cuando los genotipos susceptibles son destruidos. Ha sido demostrado que ciertas cepas de *T. cruzi* son resistentes a NFX y a BNZ. Recientemente, se ha demostrado que pacientes con ECh tratados con Itraconazol o Allopurinol y que no responden al tratamiento específico se encontraban infectados con el linaje TCI de *T. cruzi* (actual DTU TcI), mientras que en aquellos que respondieron al tratamiento el linaje encontrado correspondió a TCIIb (actual DTU TcII) (Apt, 2010). En nuestro país están presentes los DTUs TcII, TcV y TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Dado esto, es importante el reconocimiento de las distintas DTUs que puedan estar circulando en los individuos evaluados. Ya existen avances en el desarrollo de qPCR multiplex mediante sondas TaqMan® dirigidos a la detección simultánea de las distintas DTUs presentes en una muestra analizada (Bisio *et al.*, 2011).

Aquellos pacientes que, luego de aplicado el tratamiento con NFX, demuestren negativización completa de todas las técnicas parasitológicas aplicadas, tendrán un pronóstico favorable. Esta condición se cumple en 6 individuos (13,63%) evaluados en su primer control post-terapia. Esta situación da cuenta de un pronóstico auspicioso para los pacientes, dado que es conocido que gran parte del daño y de la patología crónica presente en individuos con ECh crónica, es resultado de la liberación de *T. cruzi* al torrente sanguíneo luego de su replicación en el interior de las células del hospedero (Coura y Borges-Pereira, 2012). El escenario planteado bajo estas condiciones tiene implicancias directas para el paciente tratado, puesto que una situación de baja o nula parasitemia determinada mediante qPCR es favorable en comparación a un escenario de evaluación parasitológica en el cual la batería de técnicas cualitativas (XD, PCR-XD y PCR-S), da cuenta de una constante y persistente parasitemia. Como ya se mencionó, esta condición no refleja fidedignamente el nivel parasitario presente en los individuos con ECh crónica, por lo cual qPCR debería ser el principal indicador de pronóstico y evaluación en los pacientes tratados con fármacos antichagásicos.

Del total de casos evaluados, se observa concordancia en los resultados entre las técnicas de diagnóstico molecular en un 50% (todos positivos o todos negativos). En su mayoría, las discrepancias se deben a alguno de los PCR convencionales respecto a qPCR. Estas diferencias se pueden explicar tanto por la mayor sensibilidad de qPCR para la detección

de *T. cruzi*, como por la diferencia en los partidores utilizados en cada reacción (121/122 de origen kinetoplastídico para PCR convencional y cruzi 1/cruzi 2/sonda cruzi 3 de origen nuclear para qPCR).

Finalmente, es importante considerar que todos los individuos seleccionados para este estudio, fueron evaluados en su primer control post-terapia disponible, por lo cual, la evaluación de dos o más muestras post-terapia resulta una condición imperativa para una evaluación consistente para la determinación de eficacia de NFX. Generar un juicio drástico y concluyente, resulta arriesgado y prematuro. El período de seguimiento post-terapia, fue variable entre la muestra de estudio, con rangos entre 1 a 18 meses. Fue posible encontrar resultados favorables (negativización completa) en ambos intervalos de período de seguimiento, así como también casos de aumento de parasitemia al cabo de un mes post-terapia. El periodo de seguimiento no fue uniforme entre los individuos evaluados y es posible encontrar resultados discordantes en los pacientes evaluados. Como ya se mencionó, es necesaria la evaluación en un mayor número de seguimientos para determinar la real eficacia de NFX en el tratamiento de la ECh crónica. No obstante, los resultados obtenidos en esta tesis son auspiciosos.

Pese a los efectos adversos ya reportados en este estudio (Valencia *et al.*, 2012), existe consenso que todos los pacientes con ECh deben ser tratados (con las excepciones ya mencionadas), a fin de eliminar *T. cruzi* y prevenir nuevos focos de inflamación y extensión de lesiones en los tejidos; promover la regeneración tisular previniendo de esta forma fibrosis; revertir la fibrosis existente; prevenir la cardiomiopatía, megaesófago y megacolon y finalmente, para reducir los bloqueos cardiacos y las arritmias (Coura y Borges-Pereira, 2011). La intervención terapéutica antiparasitaria precoz disminuye los costos socioeconómicos, aumenta la calidad de vida de los pacientes y la de su familia (Fuentes, *et al.*, 2011)

IX. CONCLUSIONES

- El proceso de estandarización de la metodología de qPCR aplicado al diagnóstico y seguimiento de individuos con ECh crónica es complejo y considera la optimización de una serie de etapas experimentales. Todas ellas deben ser seguidas con el mayor entendimiento y rigurosidad, en orden de contar con una reacción de qPCR estandarizada de alta sensibilidad, especificidad, confiabilidad y reproducibilidad.
- Según los resultados, la cuantificación de ADN de *T. cruzi* utilizando el equipo de qPCR Mx3000P™ Stratagene y el kit AccuBlue™ High Sensitivity dsDNA Quantitation Kit, determina diferencias en la concentración, lo que se puede deber a que la cuantificación mediante cámara de Neubauer depende del observador o bien, a pérdida de ADN parasitario durante el proceso de extracción. Con estos antecedentes, la realización de la curva estándar de *T. cruzi* para qPCR debe basarse en un método de cuantificación preciso, objetivo y estandarizado.
- Las metodologías diagnósticas convencionales para la Ech en etapa crónica, como XD, PCR-XD y PCR-S, son útiles para confirmar la presencia de *T. cruzi* circulante en los individuos evaluados en condiciones pre-terapia. No obstante, sus fundamentos teóricos implican la multiplicación del parásito en su vector biológico o de su material genético mediante PCR, por lo que la interpretación de los resultados post-terapia debe ser realizada con precaución, puesto que no representan el real nivel de parasitemia en el individuo tratado.
- La qPCR es una metodología útil para determinar los niveles reales de *T. cruzi* circulante en individuos con ECh crónica, puesto que la estimación de la parasitemia real es determinada en base a la estimación de la cantidad inicial de ADN de *T. cruzi* presente en una muestra evaluada y no a tiempo final (como si ocurre en XD, PCR-XD y PCR-S). Por tal razón, qPCR es una herramienta que debería ser considerada en el establecimiento de los criterios de eficacia quimioterapéutica.

- Los individuos evaluados en el presente estudio, presentan bajas parasitemias antes del tratamiento con NFX, concordante con la información científica disponible. Entre 1 a 18 meses post-terapia, un 6 del total de los individuos (13,36%) no evidencia *T. cruzi* con las 4 técnicas parasitológicas aplicadas. Considerando los resultados de qPCR, un 86,36% de los individuos elimina al parásito, o bien, posee niveles circulantes menores a 1 parásito por mL luego del tratamiento con NFX. Esta situación representa una condición auspiciosa para el control de la ECh crónica, más aun considerando que este estudio consideró la realización de solo una muestra en condiciones de post-terapia.

X. BIBLIOGRAFÍA

AGILENT TECHNOLOGIES, INC. 2010. Assay optimization. **En:** Introduction to quantitative PCR: Methods and Applications Guide. 47-58.

APT, W. 1999. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día*. 23: 3-4.

APT, W.; ARRIBADA, A.; ZULANTAY, I.; SOLARI, A.; SÁNCHEZ, G.; MUNDACA, K.; CORONADO, X.; RODRÍGUEZ, J.; GIL, L.C.; OSUNA, A. 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(8): 733-741.

APT, W.; HEITMANN, I.; JERCIC, M.; JOFRE, L.; MUÑOZ, P.; HAUCK, I.; SAN MARTIN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I. 2008. Guías Clínicas de la Enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infect* 25(3): 190-193.

APT, W. 2010. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug Des Devel Ther* 4: 243–253.

APT, W. 2011. Tratamiento de la enfermedad de Chagas, estado actual. *Biomédica* 31(3): 266.

APT, W.; ZULANTAY, I. 2011. Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile* 139: 247-257.

BISIO, M.M.C.; CURA, C.; DUFFY, T.; SUED, M.; QVARNSTROM, Y.; DA SILVA, A.; ORELLANA, L.; SCHIJMAN, A.G. 2011. Uso de herramientas moleculares en el diagnóstico de parasitosis: PCR en tiempo real, iniciativas en enfermedad de Chagas. *Biomédica* 31(3): 256-257.

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.

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

BRENIERE, S.F.; BOSSENO, M.F.; TELLERIA, J.; CARRASCO, R.; VARGAS, F.; YAKSIC, N.; NOIREAU, F. 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.

BRUMPT, E. 1914. Le xenodiagnóstico: Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la trypanosomose de Chagas. *Bull Soc Par Exot* 7: 706-710.

BURGOS, J.; ALTICHEH, J.; PETRUCELLI, N.; BISIO, M.; LEVIN, M.; FREILIJ, H.; SCHIJMAN, A.G. 2009. Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. *Diagn Microbiol Infect Dis* 65(1): 58-61.

BRITTO C. 2009. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 122–35.

CANALS, M.; EHRENFELD, M.; CATTAN, P.E. 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.

CANÇADO, J. R. 1999, Criteria of Chagas Disease Cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 94, Suppl. 1:331-335.

COSTA, J. 2004. Real Time PCR. *Enf Infec Microbiol Clin* 22(5): 299-304.

COURA, 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.

COURA, J.; BORGES-PEREIRA, J. 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 45(3):286-296.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. 2003. Screening and diagnostic tests. **En:** Veterinary epidemiologic research. AVC Inc., University of Prince Edward Island. Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. 85-113.

DORN, P.L.; FLORES, J.; BRAHNEY, B.; GUTIERREZ, A.; ROSALES, R.; RODAS, A.; MONROY, C. 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):503-505.

DUFFY, T.; BISIO, M.; ALTCEH, J.; BURGOS, J.M.; DIEZ, M.; SCHIJMAN, A.G. 2009. Accurate Real-Time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 3(4): e419.

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 20-11-2012]

FUENTES, B.R., MATURANA, A.M.; DE LA CRUZ, M.R. 2011. Eficacia de nifurtimox para el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica. *Rev Chil Infect* 29 (1): 82-86

GIGLIO, S.; MONIS, P.T.; SAINT, C.P. 2003. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific ADN fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Res*. 31(22): e36.

GORLA D, NOIREAU F. 2010. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. **En:** Telleria J, Tibayrenc M, editors. American trypanosomiasis (Chagas disease). One hundred years of research. Primera Ed. Burlington (VA): Elsevier Inc. 209–231.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10): 986-994.

HOTEZ, P.J.; MOLYNEUX, D.H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S.E.; SACHS, J.D.; SAVIOLI, L. 2007. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med* 357: 1018–1027.

JUNQUEIRA, A.C.; 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.

KITCHIN, P.; KLEIN, V.; ENGLAND, P. 1985. Intermediates in the replication of kinetoplast DNA minicircles. *J Biol Chem* 260: 3844-3851.

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.

MACHADO, E.M.M.; ALVARENGA, N.J.; ROMANHA, A.J.; GRISARD, E.C. 2000. A simplified method for simple collection and ADN isolation for Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in Triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(6):863-866.

MINISTERIO DE SALUD. 2011. Guía Clínica “Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas”. Santiago, Chile. 37pp.

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.

NOIREAU, F. 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. **En:** Cassab, J.A; Noireau, F.; Guillén, G. Chagas la enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del programa de control. La Paz, Bolivia. Ministerio de Salud y Previsión Social. 17-47.

OLEA, A. 1998. Situación Epidemiológica de la Enfermedad de Chagas en Chile. [en línea]. Departamento de Epidemiología. Ministerio de Salud. <<http://epi.minsal.cl/epi/html/public/chagaschile.htm>> [Consulta 20-04-2012]

OSTE, C. 1988. Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques* 6:162-167.

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.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W.C.; XAVIER, S.S.; RASSI, S.G.; RASSI, A.G.; RASSI, G.G.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SOUSA, A.S.; SCANAVACCA, M.I. 2006. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med* 355(8): 799-808.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. 2012. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect Dis Clin North Am* 26(2): 275-291.

RAY, D.S. 1989. Conserved sequence blocks in kinetoplast minicircles from diverse species of trypanosomes. *Mol Cell Biol* 9: 1365-1367.

RIRIE, K.M.; RASMUSSEN, R.P.; WITTEWER, C.T. 1997. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 245(2): 154-160.

SCHENONE, H.; ALFARO, E.; ROJAS, A. 1974. Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección humana. *Bol Chil Parasitol* 29:24-26.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M.C.; ROJAS, A. 1991. Rendimiento del xenodiagnóstico, según el número de cajas utilizadas en 1.181 personas con infección chagásica crónica diagnosticada mediante la reacción de hemoaglutinación indirecta. *Bol Chil Parasitol* 46:58-61.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M. DEL C.; SALINAS, P.; SANDOVAL, L.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. 1995a. 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.

SCHENONE, H.; CONTRERAS, M DEL C.; ROJAS, A.; VILLARROEL, F. 1995b. Positividad del xenodiagnóstico según edad, en personas con serología positiva para enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 50:40-43.

SCHENONE, H. 1999. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94: 289-294.

SCHENONE, H.; ROJAS, A.; MERCADO, R.; CASTILLO, D. 2000. Comparative study of sensitivity and mortality of *Triatoma infestans* nymphs III and IV used in the xenodiagnosis of chronic chagasic patients. *Bol Chil Parasitol* 55(1-2): 14-17.

SCHIJMAN, A.G.; ALTCHER, J.; BURGOS, J.M.; BIANCARDI, M.; BISIO, M.; LEVIN, M.J.; FREILIJ, H. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52(3): 441-449.

SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA JARAMILLO, A.M.; 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, J.E.; RAMIREZ, J.D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M.I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A.M.; GONZALEZ, C.I.; 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* 11;5(1): e931.

SHELIN, C.; RAY, D.S. 1989. Specific discontinuities in *Leishmania tarentolae* minicircles map within universally conserved sequence blocks. *Mol Biochem Parasitol* 37:151-158.

SIMPSON, L. 1987. The mitochondrial genome of kinetoplast protozoa: Genomic organization, transcription; Replication and Evolution. *Ann Rev Microbiol* 41: 363-382.

SOLARI, A.; CONTRERAS, M. DEL C.; LORCA, M.; GARCÍA, A.; SALINAS, P. 1998. Rendimiento del xenodiagnóstico y el PCR para evaluar el tratamiento quimioterapéutico específico de la enfermedad de Chagas en niños. *Bol Chil Parasitol* 53 (1-2):27-30.

SOLARI, A.; CAMPILAY, R.; ORTIZ, S.; WALLACE, A. 2001. Identification *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol* 97:226-233.

SOTO, A. 1998. Diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas a través de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Memoria para optar al título profesional de Médico Veterinario. Universidad de Chile. Santiago, Chile. 59p.

TARLETON, R.L. 2007. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol* 19(4):430-434

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. 2005. The power of real-time PCR. *Advan in Physiol Edu* 29(3): 151-159.

VALENCIA, C.N.; MANCILLA, M.; RAMOS, D.; ZULANTAY, I.; MOLINA, M.; TORRES, A.; CORRAL, G.; APT, W. 2012. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica en Chile: Efectos adversos de nifurtimox. *Rev Ibero-Latinoam. Parasitol* 71(1): 97-108.

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(5):574-82.

WALKER, N.J. 2002. Tech.Sight. A technique whose time has come. *Science* 296 (5567): 557-559.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 1991. Control of Chagas' Disease. World Health Organization. Expert Committee. Pp. 97.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(7):1051-1054.

ZULANTAY, I.; APT, W.; RODRIGUEZ, J.; VENEGAS, J.; SANCHEZ, G. 1998. Serologic evaluation of treatment of chronic Chagas disease with allopurinol and itraconazole. *Rev Med Chil* 126 (3): 265-270.

ZULANTAY, I.; APT, W.; GIL L.C.; ROCHA, C.; MUNDACA, K.; SOLARI, A.; SÁNCHEZ, G.; RODRIGUEZ, C.; MARTÍNEZ, G.; DE PABLOS, L.M.; 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):673-679.

ZULANTAY, I.; APT, W.; VALENCIA, C.; TORRES, A.; SAAVEDRA, M.; RODRÍGUEZ, J.; SANDOVAL, L.; MARTÍNEZ, G.; THIEME, P.; SEPÚLVEDA, E. 2011. Detection of *Trypanosoma cruzi* in untreated chronic chagasic patients is improved by using three parasitological methods simultaneously. *J Antimicrob Chemother* 66(10): 2224-2226.

XI. ANEXO

Tabla 19: Tabla Operacional

Población en estudio: Individuos con enfermedad de Chagas crónica Serología + (IFI y/o ELISA). EXCLUSIÓN: LACTANCIA, EMBARAZO , HEPATOPATIAS, OTROS													
MUESTRA DE ESTUDIO	PRE-TERAPIA NIFURTIMOX						TRATAMIENTO NIFURTIMOX 8 mg/kg/ día cada 8 horas, después de una ingesta de alimentos. La administración se inicia en forma escalonada iniciando 1/4 de la dosis el primer día, la mitad los días 2 y 3 y la dosis total al 4º día.	POST-TERAPIA NIFURTIMOX					
	XD 30-60-90 días	PCR-XD	PCR-S	qPCR <i>T. cruzi</i> / Control X12				XD 30-60-90 días	PCR-XD	PCR-S	qPCR <i>T. cruzi</i> / Control X12		
				qPCR <i>T. cruzi</i>	Cuantificación	qPCR X12				qPCR <i>T. cruzi</i>	Cuantificación	qPCR X12	
XD (+) 22 Pacientes	+	+/-	+/-	+/-	parásitos/mL	+		+/-	+/-	+/-	+/-	parásitos/mL	+
XD (-) 22 Pacientes	-	+/-	+/-	+/-	parásitos/mL	+		+/-	+/-	+/-	+/-	parásitos/mL	+

Muestra en estudio y técnicas parasitológicas aplicadas en esta tesis.

Tabla 20: Consolidado de resultados grupos XD (+) y XD (-) en condiciones pre-terapia con Nifurtimox

N° Caso	Grupo XD (+) PRE-TERAPIA									
	XD	XD	XD	PCR-XD	PCR-S	<i>T. cruzi</i>	qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12	Parásitos/mL	X12	Ct X12
	30 días	60 días	90 días							
2019	-	-	+	+	+	+	39,39	<1	+	31,04
1663	+	-	-	+	+	+	33,58	7,06	+	27,46
503	-	+	S/M	+	+	+	33,05	9,92	+	26,73
1208	+	+	+	+	+	+	36,24	1,28	+	31,82
892	+	+	+	+	+	+	37,11	<1	+	29,02
1398	-	+	S/M	+	+	+	37,38	<1	+	29,36
1292	+	+	+	+	+	+	39,94	<1	+	33,37
1282	+	+	+	+	+	+	36,62	3,52	+	33,05
1227	+	+	+	+	+	+	35,84	5,92	+	33,25
1402	+	+	S/M	+	+	+	38,81	<1	+	33,70
754	+	S/M	S/M	+	+	+	34,93	10,79	+	28,31
1966	-	+	+	+	+	+	38,76	<1	+	30,41
1478	+	+	S/M	+	+	+	20,74	27,780	+	27,66
1861	+	-	+	+	+	+	35,82	1,24	+	29,02
508	-	+	S/M	-	+	+	35,6	1,43	+	25,67
511	+	+	S/M	-	+	+	34,86	2,35	+	24,83
1207	+	+	+	+	+	+	36,88	<1	+	29,50
1739	-	+	S/M	+	+	+	38,41	<1	+	29,33
583	+	+	S/M	+	+	+	34,54	<1	+	28,40
2223	+	+	S/M	+	+	+	35,12	<1	+	31,85
1728	+	-	S/M	+	+	+	34,09	1,25	+	29,69
1836	+	+	-	+	+	+	37,22	<1	+	32,76
N° Caso	Grupo XD (-) PRE-TERAPIA									
	XD	XD	XD	PCR-XD	PCR-S	<i>T. cruzi</i>	qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12	Parásitos/mL	X12	Ct X12
1106	-	-	-	+	-	+	39,93	<1	+	30,51
1104	-	-	-	+	-	+	36,76	<1	+	31,31
1388	-	-	-	+	-	+	36,31	<1	+	29,49
1105	-	-	-	+	+	+	36,37	<1	+	29,59
1065	-	-	-	+	+	+	21,08	9,599	+	33,14
1975	-	-	-	+	+	+	38,12	<1	+	29,31
1984	-	-	-	+	+	+	35,01	<1	+	29,19
1218	-	-	-	+	+	+	35,62	<1	+	29,47
1048	-	-	-	-	-	-	No Ct	0	+	33,75
1770	-	-	S/M	+	+	-	No Ct	0	+	30,65
1178	-	-	-	+ leve	-	+	35,63	<1	+	31,32
1089	-	-	-	+	+ leve	+	33,56	2,1	+	29,72
1083	-	-	-	+	-	-	No Ct	0	+	33,73
1819	-	-	-	+	-	+	38,37	<1	+	29,94
1461	-	-	-	+	-	+	35,48	<1	+	28,50
1476	-	-	-	+	-	+	33,38	<1	+	28,84
1712	-	-	S/M	+	+	+	35,38	<1	+	28,58
1449	-	-	S/M	+	-	+	37,41	<1	+	30,53
1469	-	-	-	-	+	+	36,86	<1	+	28,25
1445	-	-	-	+	+	+	34,97	<1	+	30,26
1081	-	-	-	-	+	-	No Ct	0	+	28,04
1472	-	-	-	+	+	-	No Ct	0	+	26,28

Tabla 21: Consolidado de resultados grupos XD (+) y XD (-) en condiciones post-terapia con Nifurtimox

Nº CASO	Ref.	Seguimiento	Grupo XD (+) POST-TERAPIA						qPCR <i>T. cruzi</i> /Control X12				
			XD 30 días	XD 60 días	XD 90 días	PCR-XD	PCR-S	<i>T. cruzi</i>	Ct <i>T. cruzi</i>	Parásitos/mL	X12	Ct X12	
2544	2019	9 meses	-	-	-	+	+	+	36,67	<1	+	33,06	
2298	1663	8 meses	-	-	-	+	+	+	38,93	<1	+	29,33	
1824	503	4 meses	-	-	-	-	-	+	37,41	<1	+	30,14	
1743	1208	2 meses	-	-	S/M	+	+	-	No Ct	0	+	31,41	
2324	892	8 meses	-	-	-	+	-	+	38,61	<1	+	31,84	
1749	1398	10 meses	-	-	S/M	-	-	+	39,28	<1	+	28,95	
2545	1292	11 meses	-	-	S/M	+	+	+	37,15	2,49	+	33,8	
1724	1282	1 mes	-	-	S/M	-	-	+	39,79	<1	+	33,85	
1401	1227	1 mes	-	-	-	-	-	+	39,79	<1	+	32,17	
1863	1402	16 meses	-	-	-	+	-	-	No Ct	0	+	29,72	
1897	754	12 meses	-	-	-	+	+	+	34,93	1,47	+	32,23	
2403	1966	7 meses	-	-	-	-	-	+	36,4	4,08	+	35,56	
2133	1478	2 meses	-	-	S/M	-	-	-	No Ct	0	+	28,88	
2283	1861	2 meses	-	-	S/M	+ leve	+	+	36,16	<1	+	28,93	
1826	508	17 meses	-	-	-	-	-	-	No Ct	0	+	29,35	
1967	511	18 meses	-	-	-	-	-	+	38,69	<1	+	28,58	
2617	1207	8 meses	-	-	S/M	+	+	+	35,49	1,55	+	32,43	
2236	1739	4 meses	-	-	S/M	+	+	+	39,03	<1	+	29,05	
1747	583	10 meses	-	-	S/M	+	+	+	34,95	<1	+	33,26	
2586	2223	5 meses	-	-	S/M	+	+	+	32,75	2,97	+	33,74	
2018	1728	3 meses	-	-	-	+ leve	+	+	37,48	<1	+	33,19	
2238	1836	2 meses	-	-	S/M	-	-	+	36,03	<1	+	32,31	
Grupo XD (-) POST-TERAPIA													
1964	1106	17 meses	-	-	-	+	-	+	36,95	<1	+	28,91	
1676	1104	5 meses	-	-	-	-	-	-	No Ct	0	+	29,48	
1716	1388	3 meses	-	-	-	+	-	+	39,42	<1	+	29,67	
1680	1105	7 meses	-	-	-	+ leve	-	-	No Ct	0	+	29,02	
1393	1065	1 mes	-	-	-	-	-	+	36,04	<1	+	29,86	
2235	1975	2 meses	-	-	S/M	+ leve	+	+	39,51	<1	+	29,79	
2240	1984	2 meses	-	-	S/M	+	+	+	39,9	<1	+	28,93	
1400	1218	1 mes	-	-	-	+	-	+	37,35	<1	+	28,92	
1775	1048	8 meses	-	-	S/M	-	-	-	No Ct	0	+	30,5	
2131	1770	2 meses	-	-	-	+	+	+	39,09	<1	+	29,91	
1380	1178	1 mes	-	-	-	-	-	+	38,56	<1	+	29,49	
1381	1089	1 mes	-	-	-	-	-	+	31,85	6,49	+	29,54	
1423	1083	1 mes	-	-	-	-	-	+	37,86	<1	+	29,5	
2152	1819	1 mes	-	-	S/M	-	-	-	No Ct	0	+	30,01	
2155	1461	2 meses	-	-	S/M	-	-	-	No Ct	0	+	27,79	
2139	1476	1 mes	-	-	S/M	-	+	-	No Ct	0	+	27,83	
2135	1712	1 mes	-	-	S/M	+	+	-	No Ct	0	+	28,37	
2153	1449	1 mes	-	-	S/M	+	-	-	No Ct	0	+	28,01	
2166	1469	1 mes	-	-	S/M	-	-	+	38,98	<1	+	27,38	
2141	1445	1 mes	-	-	S/M	+	+	+	37,94	<1	+	28,59	
1873	1081	12 meses	-	-	-	+	+	+	39,38	<1	+	28,48	
2137	1472	2 meses	-	-	S/M	+	+	+	34,67	<1	+	26,88	