



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINA G
CONTRA *Trypanosoma cruzi* EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD
DE CHAGAS CRÓNICA TRATADOS Y NO TRATADOS CON NIFURTIMOX
EVALUADOS EN SEGUIMIENTO PROLONGADO

Gabriela Cecilia Muñoz Brito

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

PROFESORA GUÍA: DRA. INÉS ZULANTAY
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT N° 1161485
SANTIAGO, CHILE



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CUANTIFICACION DE INMUNOGLOBULINA G
CONTRA *Trypanosoma cruzi* EN INDIVIDUOS CON ENFERMEDAD
DE CHAGAS CRÓNICA TRATADOS Y NO TRATADOS CON NIFURTIMOX
EVALUADOS EN SEGUIMIENTO PROLONGADO**

Gabriela Cecilia Muñoz Brito

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

NOTA FINAL:.....

PROFESOR GUÍA : INÉS ZULANTAY

PROFESOR CORRECTOR: GALIA RAMIREZ

PROFESOR CORRECTOR: FERNANDO FREDES

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

Al proyecto Fondecyt 1161485 por financiar la realización de la tesis, a mi profesor guía Inés Zulantay, a mis compañeros del Laboratorio de Parasitología Clínica, familiares y amigos que estuvieron presentes en el trayecto.

ÍNDICE

RESUMEN	3
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	6
Generalidades y epidemiología.....	6
Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	7
Aspectos clínicos	7
Diagnóstico.....	8
Tratamiento quimioterapéutico.....	8
HIPÓTESIS	10
OBJETIVO GENERAL	10
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
Grupo de estudio	11
Muestras biológicas.....	11
Técnicas serológicas.....	12
Análisis estadístico.....	14
RESULTADOS:	15
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIÓN.....	37
BIBLIOGRAFÍA	38
ANEXOS.....	42

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas (ECh) es una zoonosis causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*. En Chile, se estima que existen aproximadamente 160.000 personas infectadas. La ECh cursa con dos etapas clínicas, la etapa aguda y la crónica; un 30% de los pacientes desarrolla cardiopatía, megasíndromes digestivos o ambos. La mayoría de los individuos se encuentran en la fase crónica indeterminada, donde los resultados de tratamiento farmacológico no han sido concluyentes, debido a que la negativización total de las pruebas serológicas convencionales requiere años de seguimiento. Nifurtimox (NF) y Benznidazol (BZ) son los únicos fármacos autorizados para el tratamiento etiológico.

El objetivo fue evaluar la eficacia de NF en el tratamiento de la ECh crónica en seguimiento prolongado utilizando parámetros serológicos, determinando si existen diferencias estadísticamente significativas entre dos grupos de estudio, utilizando las técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA. La población en estudio estuvo conformada por 100 individuos con ECh crónica tratados (6,6 años promedio), 100 individuos con ECh crónica no tratados y 100 individuos negativos para ECh. Se realizó el análisis estadístico utilizando pruebas no paramétricas en ELISA (Mann Withney: $p=0,0003$) y paramétricas en IFI (t Student: $p=0,0001$). Se logró determinar que existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en ambas pruebas. Concluyéndose que los niveles de IgG en individuos con ECh son menores en individuos tratados con NF, respecto a los no tratados, lo que indica eficacia quimioterapéutica en seguimiento prolongado.

Palabras claves: Enfermedad de Chagas crónica, inmunoglobulina G, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, Nifurtimox.

ABSTRACT

Human American Trypanosomiasis or Chagas disease (ChD) is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. Probably affects 160.000 people in Chile. ChD has two successive phases: acute and chronic. Several years of starting the chronic phase, 30% of infected individuals develop irreversible lesions of the autonomous nervous system in the heart, digestive system, or both. Mostly infected are in the indeterminate form of human chronic ChD, without conclusive results, because the total negativization of conventional serological tests requires years of follow-up. Nifurtimox (NF) and benznidazole (BZ) are the available drugs for the etiological treatment.

The aim was to evaluate the efficacy of NF in the treatment of chronic ChD using serological parameters, determining if there are statistically significant differences between three study groups, using Indirect Immunofluorescence (IFA) and ELISA techniques. Study population consisted of 100 individuals with treated chronic ChD (6.6 years average), 100 individuals with chronic untreated ChD and 100 individuals negative for ChD. Statistical analysis was performed using nonparametric tests in ELISA (Mann Withney: $p = 0.0003$) and parametric tests in IFA (Student t test: $p = 0.0001$), which allowed determining that there are statistically significant differences ($p < 0.05$) in both tests. It is concluded that the levels of IgG in individuals with ChD are lower in individuals treated with NF, compared to those not treated, indicating chemotherapeutic efficacy in prolonged follow-up.

Key words: Chronic Chagas disease, IgG, indirect immunofluorescence, ELISA, Nifurtimox

Palabras claves: Enfermedad de Chagas crónica, inmunoglobulina G, inmunofluorescencia indirecta, ELISA, Nifurtimox.

INTRODUCCIÓN

La Enfermedad de Chagas (ECh) o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Este agente se transmite principalmente mediante vectores hematófagos triatominos (Uribarren, 2016).

Según datos de la OMS, se estima que existen alrededor de 6 a 7 millones de personas infectadas con *T. cruzi* en todo el mundo, la mayoría de ellas se encuentra en zonas endémicas de América Latina, aunque la parasitosis se ha extendido a otras regiones del mundo debido a la movilidad de la población infectada procedente de países latinoamericanos endémicos. Sólo en esta Región hay 100 millones de personas en riesgo de infección, y se estima que la enfermedad causa 12.000 muertes cada año (OMS, 2016).

En Chile, la ECh se extiende desde la Región de Arica y Parinacota hasta a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins, incluyendo la Región Metropolitana, siendo más frecuente en áreas rurales. Los principales vectores hematófagos involucrados en la transmisión son insectos de la subfamilia *Triatominae*; siendo el principal vector *Triatoma infestans* (Toso *et al.*, 2011). Otros mecanismos de transmisión corresponden a la vía transfusional, transplacentaria, trasplantes de órganos infectados, accidentes de laboratorio y mediante la ingesta de alimentos contaminados (Cabello y Cabello, 2008).

En la ECh se distinguen dos fases clínicas, que determinan la elección del método diagnóstico. Fase aguda, en que los parásitos se pueden encontrar en sangre, fase crónica: asintomática o indeterminada, que puede durar toda la vida y, determinada con manifestaciones clínicas y parasitemias bajas y fluctuantes (Cabello y Cabello, 2008).

Actualmente, en el diagnóstico serológico de la ECh crónica la OMS recomienda la aplicación de al menos dos pruebas serológicas de alta sensibilidad, siendo las más utilizadas: inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y hemoaglutinación indirecta (HAI) (Farfan *et al.*, 2013).

La presente Memoria de Título tiene evaluó las diferencias cuantitativas entre los títulos de anticuerpos tipo IgG dirigidos contra *T. cruzi*, utilizando las técnicas de IFI y ELISA en individuos con ECh crónica tratados con Nifurtimox y evaluados en seguimiento prolongado, en comparación con un grupo de individuos con ECh crónica no tratado.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Generalidades y epidemiología

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una zoonosis causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por insectos triatomíneos (Hemiptera: Reduviidae) a mamíferos y viceversa (Botto, 2012).

Existen 6 a 7 millones de personas afectadas a nivel mundial (OMS, 2016) y en Chile se distribuye desde la Región de Arica y Parinacota hasta a la Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Según datos del MINSAL, en Chile hay más de 98.000 personas seropositivas (Fuenzalida, 2014), y según el ISP existen 1.200 casos nuevos por año (ISP, 2014).

En el periodo de 1990 y 2008, según el registro de enfermedades de notificación obligatoria (ENO), la tasa promedio notificación de casos se mantuvo estable en 2,95 por cien mil habitantes. En el año 2009, aumentó a 6,79 por cien mil habitantes, y en el año 2011, a 11,55 por cien mil habitantes; lo que se relaciona con situaciones contingentes que favorecieron la búsqueda activa de los casos de infecciones detectadas en tamizajes en Bancos de Sangre según las instrucciones del Ministerio de Salud (Minsal, 2011).

En la década de los ochenta, la tasa de egresos hospitalarios ascendía aproximadamente a 2 por cien mil habitantes, mientras que en la década de los noventa, disminuyó a 1,2 por cien mil habitantes. Entre el año 2001 y 2010, la tasa se ha mantenido entre 0,9 al 0,5 por cien mil habitantes, descendiendo anualmente en 0,04 por cien mil habitantes aproximadamente (Minsal, 2011).

En el periodo 2001-2010, las principales causas de egresos corresponden a cardiopatía chagásica (37.2%) y a megaformaciones del sistema digestivo (45,8%). El registro de egresos con diagnóstico de Chagas agudo no supera el 15%. En el año 2012, los casos notificados por ECh aguda son mínimos (1,88%), y en su mayoría son casos de adultos (Minsal, 2014).

Ciclo de vida de *T.cruzi*

El protozoo flagelado *T. cruzi* es un tripanosomátido que posee un ciclo de vida que involucra diversos estadios morfológicos dependiendo de la especie de hospedero (Botto, 2012). Este endoparásito presenta tres fases de desarrollo: tripomastigote, epimastigote y amastigote. El tripomastigote en sangre es la forma infectante y mide 12-30 μm , incluyendo el flagelo que se inicia en la parte posterior del parásito y emerge libre en el extremo anterior formando en su trayecto submembranal una membrana ondulante. Presenta un gran núcleo central y el kinetoplasto es grande y de ubicación subterminal. La forma de epimastigote, se encuentra en el insecto vector aunque también puede encontrarse eventualmente en vertebrados como forma de transición y en cultivos. El kinetoplasto se encuentra entre el núcleo y el flagelo libre. Por último, el amastigote intracelular constituye la forma replicativa en mamíferos. Es redondeado u ovoide y mide entre 1,5 y 4,0 μm . En él pueden apreciarse núcleo, kinetoplasto y cuerpo basal (Uribarren, 2016).

El parásito ha sido dividido en *T.cruzi* I y *T. cruzi* no-I (II-VI). *T. cruzi* I se considera predominante en México y América Central, en tanto que no-I es dominante en Sudamérica (Uribarren, 2016).

Aspectos clínicos

Fase aguda: el período de incubación es de unos 14 días y la duración del cuadro oscila entre 6 a 8 semanas. Se caracteriza por alta parasitemia e invasión tisular multi-parenquimatosa. La fase aguda se puede manifestar con fiebre, linfadenopatías, hepatoesplenomegalia y mal estado general. Durante los primeros 15 días puede presentarse el llamado "chagoma de inoculación", que corresponde a un nódulo subcutáneo con adenitis regional en el sitio de la picadura. En casos de inoculación ocular, es posible identificar, aunque poco frecuente, el "signo de Romaña", que se caracteriza por edema bupalpebral unilateral y adenitis retroauricular (Cabello y Cabello, 2008).

Fase crónica asintomática o indeterminada: aproximadamente el 70% de los pacientes cursa esta etapa, la cual no presenta síntomas, puede durar años y habitualmente, con parasitemias indetectables.

En estos casos, se han reportado anomalías anatómicas, funcionales, y muerte súbita. Estas personas son una fuente de transmisión transfusional en bancos de sangre, así como de transmisión vertical de madre a hijo (Cabello y Cabello, 2008).

Fase crónica determinada: alrededor del 30% de los pacientes desarrollan la forma crónica sintomática de la enfermedad, que se caracteriza fundamentalmente por compromiso visceral irreversible como cardiomiopatías o megasíndromes del tubo digestivo, con mayor frecuencia en colono esófago (Cabello y Cabello, 2008).

Diagnóstico

El diagnóstico de la ECh se basa en la evaluación clínica, los antecedentes epidemiológicos y las pruebas de laboratorio. Para el diagnóstico de laboratorio, los exámenes de elección dependen de la etapa clínica del paciente (Apt, 2011).

En la etapa aguda, los estudios se centran en la búsqueda y reconocimiento de *T. cruzi* en sangre utilizando métodos parasitológicos directos, a través de una muestra de sangre periférica. En etapas iniciales de la enfermedad se describen altas parasitemias y a medida que transcurre la infección van disminuyendo hasta hacerse bajas y fluctuantes (Apt *et al.*, 2008). En la etapa crónica, el diagnóstico se realiza fundamentalmente mediante el hallazgo de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi*. No obstante, las técnicas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), han mejorado considerablemente la sensibilidad de la detección de *T. cruzi* en la etapa crónica de la ECh (Uribarren, 2016).

Por otra parte, el inmunodiagnóstico de la ECh contempla la determinación de anticuerpos séricos, con al menos dos pruebas serológicas convencionales como: HAI, ELISA, IFI y Western Blot (Uribarren, 2016).

El criterio convencional de curación de la fase crónica de la ECh es la negativización de al menos dos pruebas serológicas. Sin embargo, la evolución serológica de los sujetos tratados con infección crónica por *T. cruzi* es variable (Sguassero *et al.*, 2015).

Tratamiento quimioterapéutico

Los recursos quimioterapéuticos para el tratamiento eficaz de la ECh son escasos. Al mismo tiempo, existen deficiencias en el proceso de investigación y desarrollo de nuevos

medicamentos. Los fármacos actualmente disponibles son el Benznidazol (BZ) y Nifurtimox (NF), agentes nitroheterocíclicos efectivos que actúan sobre el genoma de *T. cruzi*, inhibiendo la síntesis de DNA, RNA y de proteínas, degradando estas moléculas y, reduciendo la parasitemia. Ambos fármacos han demostrado sensibilidad selectiva sobre las diferentes cepas de *T. cruzi*. Aunque son los únicos fármacos autorizados internacionalmente para el tratamiento de la ECh, originan efectos colaterales y su eficacia es variable. El NF actúa por reducción del grupo nitro o radicales aniónicos inestables, los cuales producen una reacción, que da como resultado la generación de metabolitos oxirreducidos como el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno. *T. cruzi* es deficiente de mecanismos de detoxificación para los metabolitos del oxígeno, especialmente peróxido de hidrógeno, lo que lo hace sensible al estrés oxidativo. Actualmente, la OMS sugiere que estos fármacos son efectivos sólo en el período agudo y crónico inicial de la ECh (Apt, 2011).

El tratamiento quimioterapéutico debe mantenerse al menos durante 60 días y los criterios de cura dependen de varios factores. Algunos autores consideran que la conversión serológica es necesaria, pero para que esto suceda a veces tienen que pasar 10-20 años, existiendo casos en los que no ocurre seroconversión (Apt, 2011).

HIPÓTESIS

Los títulos de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en individuos con ECh crónica tratados con Nifurtimox, son significativamente menores a los que circulan en individuos con ECh no tratados, constituyendo evidencia de eficacia quimioterapéutica.

OBJETIVO GENERAL

Comparar los niveles de IgG contra *T. cruzi* obtenidos mediante las técnicas de IFI y ELISA en pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados y no tratados con Nifurtimox para evaluar respuesta al tratamiento.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comparar los niveles de Inmunoglobulina G contra *T. cruzi* mediante las técnicas de IFI y ELISA en pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados y no tratados con Nifurtimox.
2. Determinar la eficacia quimioterapéutica de Nifurtimox en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica evaluado a través de la disminución de la respuesta inmune contra *T. cruzi*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupo de estudio

Las muestras de los individuos en estudio fueron clasificadas de la forma siguiente:

Grupo 1: 100 individuos con ECh crónica tratados con NF

Grupo 2: 100 individuos con ECh crónica no tratados

Grupo 3: 100 individuos serológicamente negativos para ECh

Muestras biológicas

Grupo 1: Las muestras de suero de los pacientes tratados, fueron recolectadas entre los meses de junio-julio 2016 a través de trabajos de terreno realizados en las diferentes comunas de procedencia de los pacientes (Combarbalá, Illapel y Canela), los pacientes recibieron NF desde hace un tiempo de 6,6 años promedio.

Grupo 2: El Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico realiza controles clínicos periódicos a individuos con ECh crónica procedentes de las Provincias de Choapa y Limarí (realizados por el Dr. Werner Apt). De dichos casos, se conserva la información epidemiológica y las correspondientes muestras biológicas. Las muestras que se van a utilizar se han seleccionado al azar.

Grupo 3: Las muestras de suero fueron obtenidas del screening serológico realizado rutinariamente para detectar infección por *T. cruzi* en el Laboratorio Central del Centro de Diagnóstico del Hospital Barros Luco Trudeau (Gentileza TM Eric Díaz) realizado entre los períodos de enero-julio 2016 (IFI y ELISA negativo para ECh).

El esquema terapéutico de NF 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 NF 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 Baruch (Valencia *et al.*, 2012). 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 Dr. Werner Apt.

Todos los pacientes aceptaron formar parte del estudio mediante Consentimiento Informado (Proyecto 1161485) aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Anexo 1).

Las muestras de suero de los grupos 1-2-3 fueron mantenidas en el laboratorio a -20°C.

Técnicas serológicas

Para la cuantificación serológica de las muestras se utilizaron las técnicas de ELISA indirecto e IFI indirecto.

ELISA IgG: Para el procedimiento, se diluyó la solución de lavado 25X (solución amortiguadora salina de pH 7,5 y 0,02% de timerosal) con agua destilada o desionizada. Se preparó 50 mL de solución al 4%. Los pocillos correspondientes al número de muestras a analizar se ubicaron en el soporte, incluyendo dos pocillos para el control negativo y dos pocillos para el control positivo. Se agregó a cada pocillo 200 µL de diluyente (proteínas estabilizadoras y 0,02% de timerosal). Se agregó 20 µL de cada muestra, las cuales fueron evaluadas en duplicado. Cada muestra viró de color según su naturaleza; con suero o plasma cambió a azul, si la muestra era positiva cambió a turquesa, en cambio si fue negativa, arrojó un color verde. Se sellaron las placas con autoadhesivos y se incubaron por 30 minutos a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Se sacó el adhesivo y se lavaron las placas. Para esto se eliminó el contenido y se agregó a cada pocillo 350 µL de solución de lavado diluida. Después de lavar se invirtieron las

placas y se golpeó sobre papel absorbente para eliminar cualquier exceso de líquido del pocillo. Se agregó 100 µL de conjugado a cada pocillo. Se selló la placa con autoadhesivo limpio y se incubó por 30 minutos a 37°C. Se lavó de igual forma a la ya descrita y se agregó 100 µL de sustrato a cada pocillo. Se incubó la placa en oscuridad durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción agregando 100 µL de solución de detención (ácido sulfúrico 3N).

Los resultados se analizaron en un lector de microplacas utilizando un filtro de 450 nm. Se calculó el punto de corte a partir de los valores de absorbancia o densidad óptica (DO) de los pocillos correspondientes a los controles positivos y negativos.

El punto de corte se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Punto de corte} = (\bar{X}CN + \bar{X}CP) * 0.35$$

Una muestra era considerada positiva cuando su absorbancia resultara mayor al punto de corte (Lorca *et al.*, 1990).

IFI IgG: Se prepararon los pocillos y portaobjetos que fueron utilizados con cada muestra, manteniéndose en una estufa a 100°C por 20 minutos. Se conservaron a -20°C hasta su uso. Para realizar la técnica fue necesario retirar las placas y dejar secar a temperatura ambiente. Se agregó a cada pocillo 25 µL de la solución parasitaria (formalina 37% más buffer fosfato pH 7,2). Se dejó decantar por aproximadamente 2 a 4 minutos. Se extrajo de cada pocillo 15 µL. Consecutivamente, se guardaron las placas en papel de aluminio a -20°. Para la técnica se debía tener preparado el buffer, que consistió en buffer fosfato de potasio, buffer fosfato de sodio y buffer fosfato pH 7,2.

El suero de los pacientes antes de ser usado debió ser inactivado, para esto se mantuvieron los sueros en una gradilla y se sometieron a baño María a 57°C por 30 minutos. Luego de la inactivación, se dio paso a la dilución del suero; se diluyó 50 µL en buffers en 8 diluciones. Posteriormente, las muestras se situaron en una placa húmeda a 37°C por 45 minutos, se realizaron dos lavados de 10 minutos con buffer fosfato pH 7,2. Se secaron y agregó 15 µL de conjugado, para luego repetir el procedimiento inicial hasta los lavados. Se secaron los pocillos a temperatura ambiente hasta que quedaron completamente secos. Se agregó 8 µL de glicerina a cada pocillo de cada placa. Se cubrieron los pocillos con un cubreobjeto y

fueron leídos al microscopio de fluorescencia. El criterio de positividad en Chile se estima como título diagnóstico 1/20 (Astorga *et al.*, 1998).

Como indicador de eficacia quimioterapéutica se consideró la diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en los niveles de IgG obtenidos mediante las técnicas de IFI y ELISA entre los individuos tratados y no tratados.

Análisis estadístico

Los datos fueron ingresados en planilla Excel y analizados en el Programa STATA, versión 19. Los resultados fueron presentados en tablas y gráficos. Para comparar los títulos y DO de ELISA IgG e IFI IgG respectivamente, entre los grupos tratados y no tratados. Se aplicaron las pruebas de Shapiro Wilk (normalidad) y Levene (homocedasticidad de varianza). De acuerdo al análisis preliminar, se aplicaron las pruebas de t-Student y Mann-Whitney.

RESULTADOS:

1.1 Resultados ELISA

Para verificar diferencias estadísticamente significativas en los niveles de IgG entre los grupos tratados y no tratados, en primera etapa se realizó el estudio serológico de las muestras; aplicando la técnica de ELISA IgG, para determinar la densidad óptica (DO) de cada individuo (TABLAS 1, 2, 3).

Tabla 1. Índice de Densidad óptica (DO) obtenidas en ensayo de ELISA IgG, en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.

Paciente	DO	Título	Paciente	DO	Título	Paciente	DO	Título
4034	1,858	(+)	4074	1,597	(+)	4118	1,691	(+)
4035	2,053	(+)	4075	1,577	(+)	4119	1,640	(+)
4036	2,051	(+)	4076	2,306	(+)	4120	1,405	(+)
4037	1,978	(+)	4077	1,923	(+)	4121	1,713	(+)
4038	1,746	(+)	4078	1,779	(+)	4122	2,217	(+)
4039	2,436	(+)	4080	1,870	(+)	4123	1,337	(+)
4048	1,632	(+)	4081	1,877	(+)	4124	1,376	(+)
4041	2,329	(+)	4082	1,379	(+)	4125	1,283	(+)
4042	1,670	(+)	4083	1,248	(+)	4126	1,679	(+)
4043	1,400	(+)	4089	1,988	(+)	4127	1,561	(+)
4044	1,118	(+)	4090	2,547	(+)	4128	1,776	(+)
4045	2,074	(+)	4091	1,576	(+)	4129	1,499	(+)
4046	1,671	(+)	4092	1,608	(+)	4130	1,654	(+)
4047	1,685	(+)	4093	1,979	(+)	4131	1,917	(+)
4049	2,549	(+)	4094	1,306	(+)	4132	1,460	(+)
4050	1,705	(+)	4095	1,747	(+)	4133	1,801	(+)
4051	2,265	(+)	4096	1,793	(+)	4134	1,752	(+)
4052	1,759	(+)	4097	1,878	(+)	4135	1,340	(+)
4053	1,320	(+)	4098	1,378	(+)	4136	1,763	(+)
4054	2,885	(+)	4099	1,844	(+)	4137	1,136	(+)

4055	2,445	(+)	4100	1,760	(+)	4140	2,214	(+)
4056	2,020	(+)	4101	1,130	(+)	4141	2,02	(+)
4057	1,633	(+)	4102	1,589	(+)	4142	2,251	(+)
4058	1,756	(+)	4103	1,402	(+)	4143	1,983	(+)
4060	2,076	(+)	4104	1,699	(+)	4144	2,023	(+)
4061	2,096	(+)	4105	1,416	(+)	4145	2,056	(+)
4062	2,198	(+)	4106	1,658	(+)	4109	0,722	(+)
4063	1,771	(+)	4107	1,990	(+)	4110	1,453	(+)
4064	1,563	(+)	4108	2,010	(+)	4111	1,662	(+)
4065	1,841	(+)	4069	2,227	(+)	4112	2,568	(+)
4066	1,461	(+)	4070	0,995	(+)	4113	2,155	(+)
4067	1,444	(+)	4071	1,366	(+)	4114	1,968	(+)
4068	1,813	(+)	4072	2,269	(+)	4115	2,268	(+)
4117	1,098	(+)	4073	2,236	(+)	4116	1,724	(+)

Tabla 2. Índice de Densidad óptica (DO) obtenidas en ensayo de ELISA IgG, en individuos con enfermedad de Chagas crónica no tratados.

Paciente	DO	Título	Paciente	DO	Título	Paciente	DO	Título
2976	1,264	(+)	3678	1,210	(+)	3860	1,684	(+)
2502	2,943	(+)	3680	1,175	(+)	3861	1,386	(+)
3034	2,067	(+)	3683	1,648	(+)	3864	2,485	(+)
3168	1,681	(+)	3704	0,982	(+)	3865	1,712	(+)
3173	2,703	(+)	3706	2,624	(+)	3866	1,413	(+)
3174	1,865	(+)	3707	1,315	(+)	3867	1,231	(+)
3185	2,107	(+)	3710	2,054	(+)	3868	0,520	(+)
3186	1,388	(+)	3712	2,692	(+)	3869	2,286	(+)
3283	1,896	(+)	3714	2,695	(+)	3870	1,997	(+)
3286	2,212	(+)	3715	1,914	(+)	3871	1,314	(+)
3330	2,149	(+)	3717	2,587	(+)	3873	2,441	(+)
3333	2,234	(+)	3722	2,157	(+)	3874	1,762	(+)

3340	2,103	(+)	3723	2,392	(+)	3876	2,241	(+)
3389	2,398	(+)	3738	2,214	(+)	3878	2,187	(+)
3410	1,995	(+)	3741	2,077	(+)	3880	2,361	(+)
3591	2,320	(+)	3747	2,958	(+)	3883	2,241	(+)
3594	2,130	(+)	3748	1,395	(+)	3888	1,938	(+)
3595	1,872	(+)	3752	1,395	(+)	3891	1,834	(+)
3602	2,422	(+)	3755	2,406	(+)	3893	2,013	(+)
3603	2,210	(+)	3756	0,996	(+)	3895	1,316	(+)
3605	2,404	(+)	3758	2,169	(+)	3899	2,642	(+)
3607	2,528	(+)	3761	1,484	(+)	3904	1,967	(+)
3608	2,437	(+)	3762	2,408	(+)	3905	1,942	(+)
3613	1,488	(+)	3763	1,541	(+)	3906	2,263	(+)
3616	2,095	(+)	3781	0,885	(+)	3922	2,0825	(+)
3617	2,216	(+)	3801	2,823	(+)	3863	2,056	(+)
3620	1,954	(+)	3807	1,657	(+)	4109	0,722	(+)
3622	2,163	(+)	3809	0,859	(+)	4110	1,453	(+)
3647	1,937	(+)	3811	2,023	(+)	4111	1,662	(+)
3663	1,435	(+)	3812	2,121	(+)	4112	2,568	(+)
3667	1,367	(+)	3820	2,406	(+)	4113	2,155	(+)
3670	1,333	(+)	3823	2,239	(+)	4114	1,968	(+)
3675	1,337	(+)	3824	1,949	(+)	4115	2,268	(+)
3676	1,270	(+)	4073	2,236	(+)	4116	1,724	(+)
3678	1,210	(+)	3825	2,040	(+)	3833	1,673	(+)
3680	1,175	(+)	3826	2,766	(+)	3835	1,485	(+)
3683	1,648	(+)	3831	2,547	(+)	3728	2,533	(+)
3704	0,982	(+)	3832	2,646	(+)	3840	1,921	(+)
3706	2,624	(+)	3710	2,054	(+)	3841	1,861	(+)
3707	1,315	(+)	3712	2,692	(+)	3714	2,695	(+)

Tabla 3. Índice de Densidades ópticas (DO) obtenidas en ensayo de ELISA IgG, en grupo control, correspondiente a sueros de individuos donantes de Banco de Sangre serológicamente negativos para enfermedad de Chagas

Paciente	DO	Título	Paciente	DO	Título	Paciente	DO	Título
6141008	0,011	(-)	6291497	0,090	(-)	3910	0,012	(-)
6131925	0,098	(-)	7130735	0,133	(-)	3908	0,023	(-)
6131015	0,097	(-)	7130728	0,037	(-)	3897	0,023	(-)
6231019	0,195	(-)	7131048	0,051	(-)	3890	0,020	(-)
6231474	0,049	(-)	7271007	0,083	(-)	3887	0,007	(-)
6201004	0,063	(-)	7191936	0,190	(-)	3882	0,012	(-)
6162064	0,123	(-)	7190736	0,188	(-)	4028	0,151	(-)
6201019	0,078	(-)	7221071	0,122	(-)	4027	0,180	(-)
6152012	0,071	(-)	7190717	0,137	(-)	3852	0,153	(-)
6102041	0,019	(-)	7260710	0,141	(-)	3854	0,231	(-)
6280718	0,093	(-)	7270724	0,141	(-)	3836	0,138	(-)
6141015	0,082	(-)	7202026	0,166	(-)	3827	0,195	(-)
6141021	0,116	(-)	7291010	0,101	(-)	3788	0,161	(-)
6230713	0,054	(-)	7250734	0,159	(-)	3697	0,008	(-)
6230701	0,119	(-)	7200292	0,204	(-)	3695	0,003	(-)
6230707	0,059	(-)	7250733	0,096	(-)	3691	0,009	(-)
6220740	0,057	(-)	7291500	0,074	(-)	3685	0,041	(-)
6220262	0,077	(-)	7202022	0,179	(-)	3660	0,011	(-)
6240706	0,067	(-)	7180716	0,123	(-)	3659	0,006	(-)
6240734	0,062	(-)	7201487	0,106	(-)	3643	0,011	(-)
6082062	0,076	(-)	4007	0,173	(-)	3827	0,251	(-)
6200730	0,189	(-)	3999	0,001	(-)	3836	0,255	(-)
6281008	0,14	(-)	3998	0,001	(-)	3977	0,010	(-)
6300710	0,132	(-)	3997	0,001	(-)	3975	0,048	(-)
7070726	0,04	(-)	3995	0,034	(-)	3973	0,014	(-)
6170731	0,067	(-)	3994	0,018	(-)	3971	0,028	(-)

6300322	0,063	(-)	3757	0,007	(-)	3969	0,001	(-)
7040734	0,074	(-)	3990	0,001	(-)	3917	0,010	(-)
7051007	0,076	(-)	3988	0,004	(-)	3916	0,012	(-)
7040730	0,069	(-)	3985	0,024	(-)	7042064	0,076	(-)
7050704	0,091	(-)	3983	0,016	(-)	7121003	0,119	(-)
7050728	0,083	(-)	3981	0,018	(-)	7051937	0,073	(-)
6290709	0,061	(-)	3979	0,028	(-)	7121017	0,123	(-)
6290732	0,080	(-)	7120714	0,094	(-)	7120714	0,077	(-)

Posteriormente, los datos fueron ordenados según la frecuencia de las DO obtenidas en cada grupo (Tabla 4), a fin de facilitar la representación gráfica a través de datos agrupados en intervalos (Gráfico 1)

Tabla 4. Intervalos de frecuencia de densidades ópticas en el grupo de individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox, respecto a grupo no tratado.

Intervalo	Límite inferior	Límite superior	Rango	Individuos tratados	Individuos no tratados
1	0,001	0,301	0,001-0,301	0	0
2	0,302	0,602	0,302-0,602	0	1
3	0,603	0,903	0,603-0,903	3	2
4	0,904	1,204	0,904-1,204	5	2
5	1,205	1,505	1,205-1,505	19	19
6	1,506	1,806	1,506-1,806	37	8
7	1,807	2,107	1,807-2,107	21	24
8	2,108	2,408	2,108-2,408	11	25
9	2,409	2,709	2,409-2,709	4	15
10	2,710	3,010	2,710-3,01	1	4

Escala de 10 intervalos de densidad óptica agrupada en rangos de 0,300 nm.

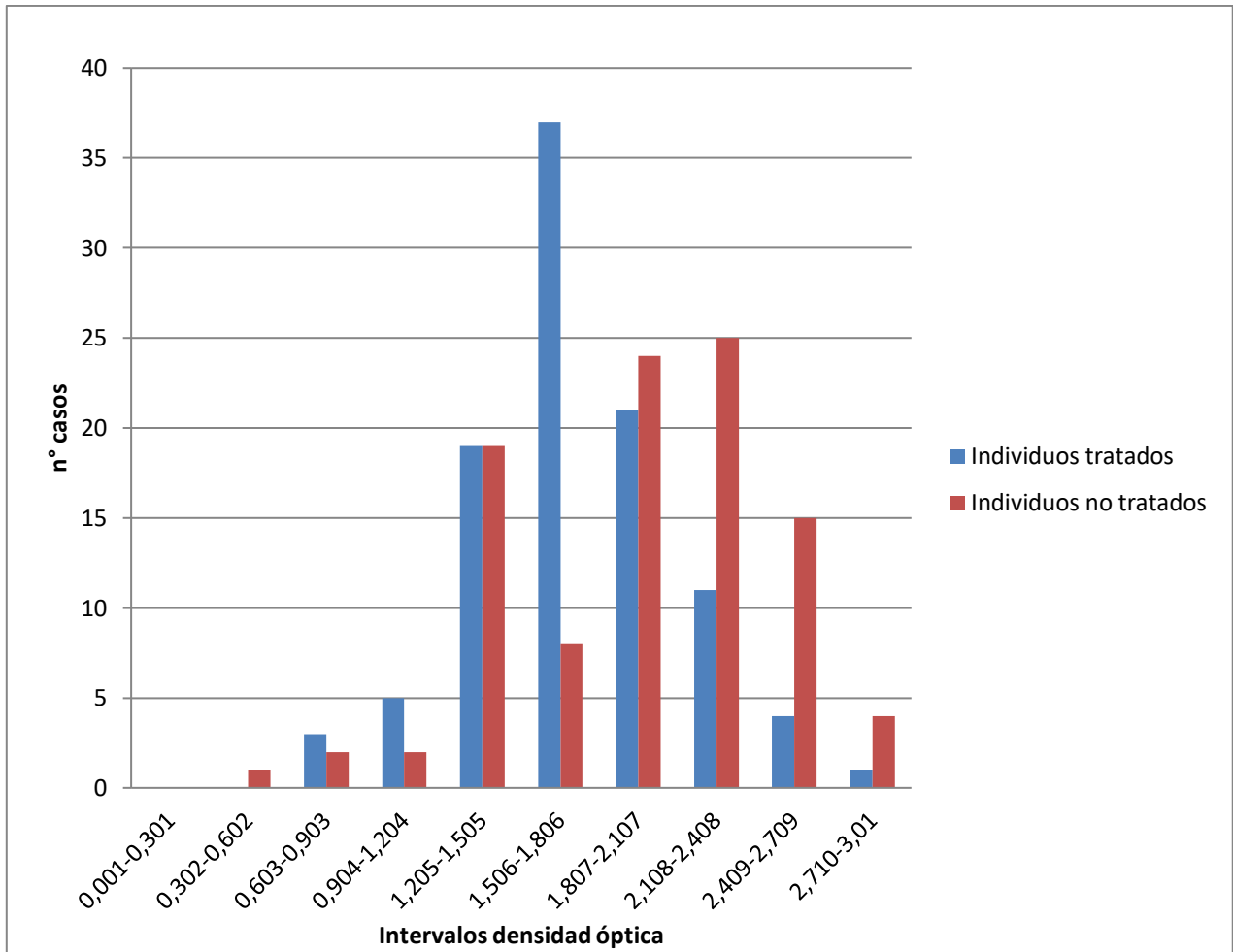


Grafico 1. Índice de densidad óptica, según intervalos de frecuencia, en individuos con enfermedad de Chagas crónica pertenecientes al grupo tratado con Nifurtimox y grupo no tratado.

Como se evidencia en la Tabla 4 y Gráfico 1, del total de sueros analizados: existen 68 (68%) individuos infectados no tratados en que la DO se encuentra sobre 1,807 nm, mientras que 68 (68%) de los individuos tratados con NF se encuentran en un rango inferior a éste.

A través del programa STATA versión 19, se aplicó la prueba de Shapiro Wilk en cada uno de los grupos de estudio (Tabla 5 y 6), para de determinar el tipo de distribución de las poblaciones, considerando una distribución normal $p > 0,05$.

Los resultados obtenidos fueron: para el grupo que no recibió tratamiento $p = 0,0919$ (Tabla 6) con distribución normal de la población ($p > 0,05$), lo que difirió del grupo tratado (Tabla 5), donde se obtuvo $p < 0,0001$, por tanto, el análisis demuestra que la distribución de datos no es normal.

Como no se cumplían los supuestos requeridos para realizar el análisis mediante pruebas paramétricas, se aplicó la prueba no paramétrica de Mann Withney, con el fin de determinar a través de comparación de medianas, si las diferencias entre DO eran estadísticamente significativas (Tabla 6).

Tabla 5. Análisis de Shapiro Wilk de Densidad óptica obtenidas mediante ELISA en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.

Variable	Obs	W	V	z	Prob> z
DO	101	0.28426	59.588	9.072	0.00000

Tabla 6. Análisis de Shapiro Wilk de Densidad óptica obtenidas mediante ELISA en individuos con enfermedad de Chagas crónica no tratados.

Variable	Obs	W	V	z	Prob> z
DO	100	0.97754	1.855	1.370	0.08528

La prueba de diferencia de medianas (Tabla 7) de Mann Withney obtuvo como resultado $p = 0,0003$ (ANEXO 2), considerando estadísticamente significativo $p < 0,05$, lo que indica que existen diferencias estadísticamente significativas entre los índices de DO obtenido

mediante técnica de ELISA, entre individuos con ECh crónica tratados con NF, respecto a los individuos no tratados. Para finalizar el análisis, se realizó un gráfico de la distribución de los distintos grupos respecto a su mediana (Gráfico 2).

Tabla 7. Relación entre medianas y límites de rangos de densidad óptica determinada mediante técnica de ELISA en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox, en comparación a individuos no tratados.

		Tratado	No Tratado
ELISA DO	Mediana	1,756	2,056
	Rango	0,232-2,885	0, 520-2,958

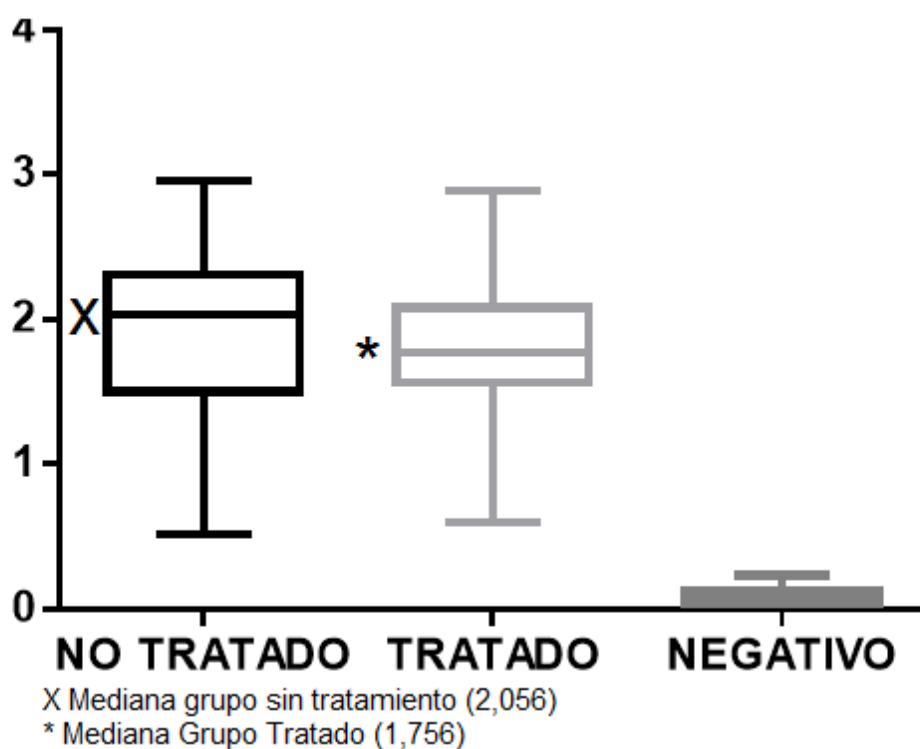


Gráfico 2. Distribución de individuos con enfermedad de Chagas crónica respecto a su mediana, en grupo tratado con Nifurtimox, no tratado y negativos.

1.2 Resultados IFI

Para el segundo análisis, se determinó el título de anticuerpo IgG contra *T. cruzi* de la muestra correspondiente a cada individuo utilizando la prueba de IFI, posteriormente se tabularon los datos (Tablas 8, 9 y 10).

Tabla 8. Resultados obtenidos mediante IFI IgG en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.

Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título
4034	1/160	4073	1/1280	4057	1/160	4101	1/160	4047	1/320
4035	1/640	4074	1/160	4058	1/320	4102	1/640	4049	1/1280
4036	1/640	4075	1/160	4060	1/640	4103	1/160	4050	1/1280
4037	1/1280	4076	1/640	4061	1/640	4104	1/160	4034	1/160
4038	1/640	4077	1/320	4062	1/640	4105	1/160	4035	1/640
4039	1/1280	4078	1/320	4063	1/320	4106	1/320	4036	1/640
4048	1/640	4080	1/320	4064	1/160	4107	1/1280	4037	1/1280
4041	1/1280	4081	1/320	4065	1/640	4108	1/1280	4038	1/640
4042	1/320	4082	1/320	4066	1/320	4109	NEG	4039	1/1280
4043	1/320	4083	1/320	4067	1/160	4110	1/160	4129	1/320
4044	1/160	4089	1/1280	4068	1/320	4111	1/160	4130	1/80
4045	1/1280	4090	1/1280	4069	1/1280	4112	1/1280	4131	1/1280
4046	1/320	4091	1/320	4070	1/80	4113	1/1280	4051	1/1280
4047	1/320	4092	1/160	4071	1/160	4114	1/640	4052	1/640
4049	1/1280	4093	1/1280	4072	1/640	4115	1/1280	4053	1/160
4050	1/1280	4094	1/160	4077	1/320	4114	1/640	4054	1/1280
4034	1/160	4116	1/160	4078	1/320	4115	1/1280	4055	1/1280
4035	1/640	4117	1/160	4080	1/320	4116	1/160	4056	1/1280
4036	1/640	4118	1/320	4081	1/320	4117	1/160	4097	1/320
4037	1/1280	4119	1/160	4082	1/320	4118	1/320	4098	1/1280
4038	1/640	4120	1/80	4083	1/320	4119	1/160	4099	1/640

4039	1/1280	4121	1/640	4089	1/1280	4120	1/80	4095	1/320
4048	1/640	4122	1/1280	4090	1/1280	4121	1/640	4096	1/160
4041	1/1280	4123	1/160	4091	1/320	4132	1/160	4097	1/320
4042	1/320	4124	1/1280	4092	1/160	4133	1/320	4098	1/1280
4043	1/320	4125	1/640	4093	1/1280	4134	1/320	4099	1/640
4044	1/160	4126	1/160	4094	1/160	4135	1/160	4100	1/640
4045	1/1280	4127	1/160	4095	1/320	4136	1/320	4140	1/1280
4046	1/320	4128	1/320	4096	1/160	4137	1/80	4141	1/640

Tabla 9. Resultados obtenidos mediante IFI IgG, en individuos con enfermedad de Chagas crónica no tratados.

Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título
2976	1/80	3607	1/640	3748	1/80	3831	1/1280	3762	1/1280
2502	1/1280	3608	1/1280	3752	1/160	3832	1/1280	3763	1/160
3034	1/640	3613	1/320	3755	1/640	3833	1/160	3801	1/1280
3168	1/320	3616	1/1280	3758	1/640	3835	1/40	3807	1/320
3173	1/1280	3617	1/1280	3761	1/160	3728	1/1280	3809	1/20
3174	1/320	3620	1/640	3762	1/1280	3840	1/1280	3811	1/1280
3185	1/640	3622	1/640	3763	1/160	3841	1/1280	3812	1/1280
3186	1/320	3647	1/320	3801	1/1280	3860	1/1280	3899	1/1280
3283	1/640	3663	1/320	3807	1/320	3680	1/160	3904	1/1280
3286	1/1280	3667	1/1280	3809	1/20	3683	1/640	3905	1/1280
3330	1/640	3670	1/640	3811	1/1280	3861	1/640	3906	1/1280
3333	1/640	3675	1/320	3812	1/1280	3864	1/1280	3922	1/1280
3340	1/1280	3676	1/640	3820	1/1280	3865	1/1280	3863	1/1280
3389	1/640	3678	1/320	3823	1/1280	3866	1/1289	3663	1/320
3591	1/640	3680	1/160	3824	1/1280	3867	1/640	3871	1/320
3594	1/1280	3683	1/640	3825	1/1280	3868	1/40	3873	1/1280
3595	1/640	3706	1/1280	3826	1/1280	3715	1/640	3874	1/1280

3602	1/1280	3707	1/40	3831	1/1280	3717	1/640	3876	1/1280
3603	1/640	3710	1/640	3832	1/1280	3722	1/640	3878	1/1280
3605	1/1280	3712	1/1280	3833	1/160	3723	1/1280	3880	1/1280
3714	1/1280	3869	1/1280	3835	1/40	3738	1/1280	3883	1/1280
3715	1/640	3870	1/1280	3728	1/1280	3741	1/640	3823	1/1280
3717	1/640	3871	1/320	3840	1/1280	3747	1/1280	3667	1/1280
3722	1/640	3873	1/1280	3841	1/1280	3824	1/1280	3670	1/640
3723	1/1280	3874	1/1280	3860	1/1280	3825	1/1280	3706	1/1280
3738	1/1280	3876	1/1280	3861	1/640	3826	1/1280	3707	1/80
3741	1/640	3878	1/1280	3864	1/1280	3675	1/320	3706	1/1280
3747	1/1280	3880	1/1280	3865	1/1280	3676	1/640	3707	1/80
3748	1/80	3883	1/1280	3866	1/1289	3678	1/320	3758	1/640
3752	1/160	3888	1/320	3867	1/640	3710	1/640	3761	1/160
3755	1/640	3891	1/1280	3868	1/40	3712	1/1280	3893	1/1280
3895	1/640	3870	1/1280	3869	1/1280	3714	1/1280	3820	1/1280

Tabla 10. Resultado obtenido mediante IFI IgG en grupo control, correspondiente a sueros de individuos donantes de Banco de Sangre serológicamente negativos para enfermedad de Chagas.

Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título	Paciente	Título
6141008	(-)	7121003	(-)	3971	(-)	3908	(-)	6290732	(-)
6131925	(-)	7051937	(-)	3969	(-)	3897	(-)	7120714	(-)
6131015	(-)	6291497	(-)	3917	(-)	3890	(-)	7120714	(-)
6231019	(-)	7130735	(-)	3916	(-)	3887	(-)	7121017	(-)
6231474	(-)	7130728	(-)	3910	(-)	3882	(-)	7042064	(-)
6201004	(-)	7131048	(-)	3908	(-)	4028	(-)	3908	(-)
6162064	(-)	7271007	(-)	3897	(-)	4027	(-)	3897	(-)
6201019	(-)	7191936	(-)	3890	(-)	3852	(-)	3890	(-)
6152012	(-)	7190736	(-)	3887	(-)	3854	(-)	3887	(-)

6102041	(-)	7221071	(-)	3882	(-)	3836	(-)	3882	(-)
6280718	(-)	7190717	(-)	4028	(-)	3788	(-)	4027	(-)
6141015	(-)	7260710	(-)	4027	(-)	3697	(-)	3852	(-)
6141021	(-)	7270724	(-)	3852	(-)	3695	(-)	3854	(-)
6230713	(-)	7202026	(-)	3854	(-)	3691	(-)	3836	(-)
6230701	(-)	7291010	(-)	3836	(-)	3685	(-)	3827	(-)
6230707	(-)	7250734	(-)	3827	(-)	3660	(-)	3685	(-)
6220740	(-)	7200292	(-)	3788	(-)	3659	(-)	3660	(-)
6220262	(-)	7250733	(-)	7291500	(-)	3643	(-)	3659	(-)
6240706	(-)	7291500	(-)	7202022	(-)	3827	(-)	3643	(-)
6240734	(-)	7202022	(-)	7180716	(-)	3836	(-)	7202026	(-)
6082062	(-)	7180716	(-)	7201487	(-)	3981	(-)	7291010	(-)
6200730	(-)	7201487	(-)	4007	(-)	3979	(-)	7250734	(-)
6281008	(-)	6291497	(-)	3999	(-)	3977	(-)	7200292	(-)
6300710	(-)	7130735	(-)	3998	(-)	3975	(-)	7250733	(-)
7070726	(-)	7130728	(-)	3997	(-)	3973	(-)	3695	(-)
6170731	(-)	7131048	(-)	3995	(-)	3971	(-)	3691	(-)
6300322	(-)	7271007	(-)	3994	(-)	7050704	(-)	7190717	(-)
7040734	(-)	7191936	(-)	3757	(-)	7050728	(-)	7260710	(-)
7051007	(-)	7190736	(-)	3990	(-)	6290709	(-)	7270724	(-)

Los datos fueron agrupados en intervalos, según el título obtenido en ambos grupos (Tabla 11), para facilitar su representación gráfica (Gráfico 3).

Tabla 11. Intervalos de frecuencia títulos de anticuerpo IgG contra *T. cruzi*, obtenidos a través de IFI IgG en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox, e individuos no tratado.

Dilución	Tratados	No Tratados
NEGATIVOS	1	0
1/10	0	0
1/20	1	1
1/40	0	3
1/80	3	3
1/160	27	5
1/320	24	11
1/640	18	26
1/1280	25	51

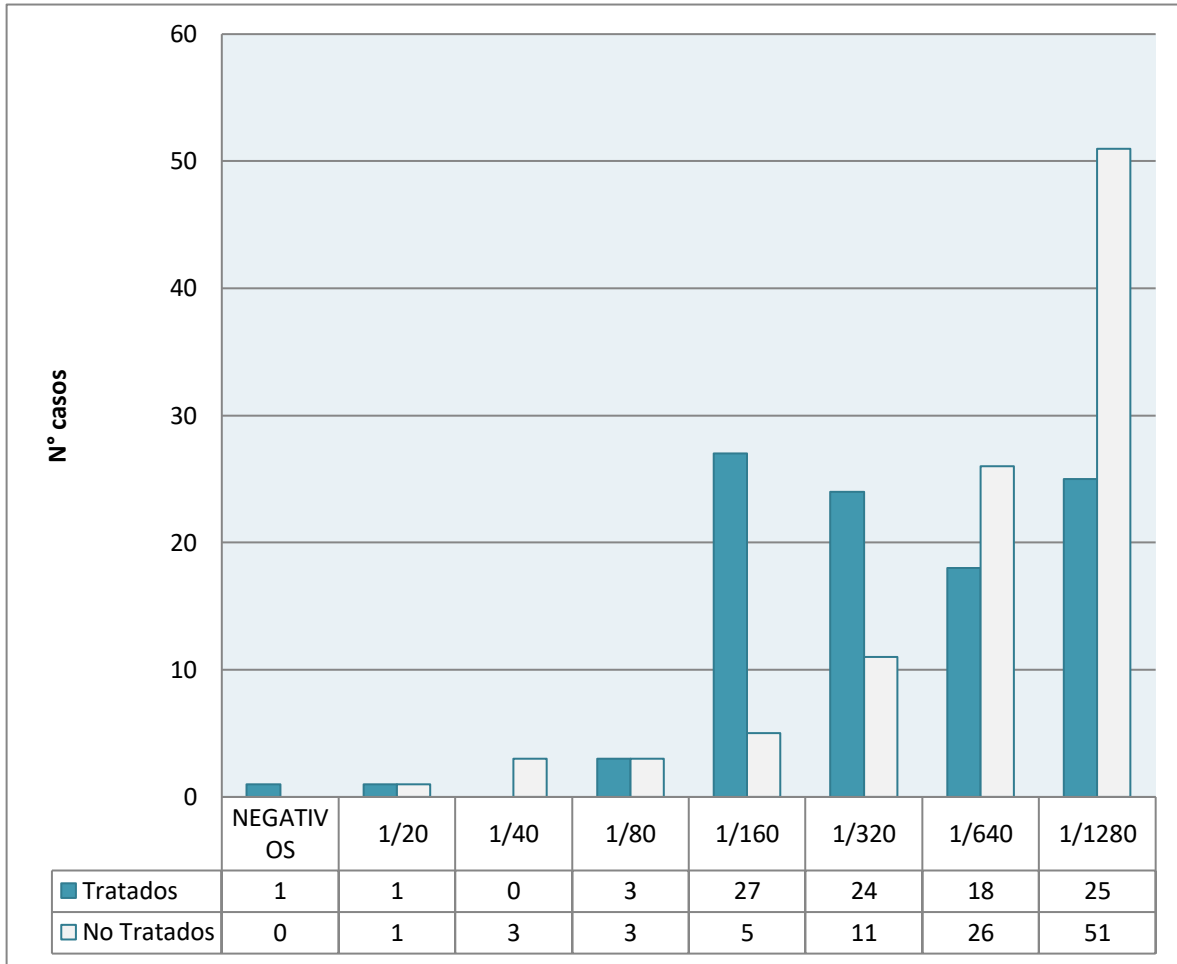


Gráfico 3. Comparación de intervalos de títulos de anticuerpo IgG obtenidos a través de IFI, individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox, respecto a individuos sin tratamiento.

Como se puede observar en la tabla 11 y gráfico 4, más de la mitad (51 casos, 51%) de los casos del grupo no tratado, se encuentran en el último punto de corte de las diluciones (1/1280). También se puede observar que un individuo tratado resultó negativo en su prueba de IFI, lo que sería concordante con el resultado de ELISA, la cual se encontraba cercana al punto de corte (CASO: 4109, DO ELISA: 0,722, punto de corte del ensayo: 0,69).

Utilizando el programa STATA v19, a los títulos obtenidos fueron analizados utilizando la prueba estadística de Shapiro Wilk, a fin de determinar el tipo de distribución de las poblaciones, considerando una distribución normal $p > 0,05$. (Tablas 12 y 13).

Tabla 12. Análisis Shapiro Wilk, de títulos de anticuerpo IgG obtenidos por IFI, en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox.

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IFI	100	0.83876	13.424	5.764	0.00000

Tabla 13. Análisis Shapiro Wilk, de títulos de anticuerpo IgG obtenidos por IFI, en individuos con enfermedad de Chagas crónica sin tratamiento.

Variable	Obs	W	V	z	Prob>z
IFI	100	0.80618	16.003	6.151	0.00000

La prueba de Shapiro Wilk resultó en $p < 0,0001$ en ambos grupos, por lo tanto ninguno se distribuía de forma normal.

Posteriormente se realizó el análisis de distribución de la varianza, utilizando la prueba de Levene (Tabla 14)

Tabla 14. Análisis de distribución de varianzas de individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox y no tratados, mediante la prueba de Levene.

Group	Obs	Mean	Std. Err	Std. Dev	[95% Conf. Interval]
No tratado	100	6.148515	.1625211	5.826078	6.470952
Tratado	100	7.04	.1355274	6.771084	7.308916
combined	200	6.59204	.1102403	6.374657	6.809422

Ha: ratio < 1

Ha: ratio != 1

Ha: ratio > 1

Pr(F < f) = 0.9679

2*Pr(F > f) = 0.0642

Pr(F > f) = 0.0321

Prueba de Levene $p = 0,0642$ (igualdad de las varianzas $p > 0,05$), por lo tanto, el análisis demuestra que hay homocedasticidad de varianzas.

Cumpliendo los dos requisitos necesarios para utilizar pruebas paramétricas, se aplicó la prueba de t Student (Tabla 15) para determinar a través de la comparación de medias (Tabla 16), si existen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 15. Análisis de t Student, de los títulos de anticuerpo obtenidos por IFI, en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox, respecto a individuos no tratados.

Group	Obs	Mean	Std. Err	Std. Dev	[95% Conf. Interval]
No tratado	100	6.148515	.1625211	5.826078	6.470952
Tratado	100	7.04	1.633316	6.771084	7.308916
	200	6.59204	.1102403	1.562926	
		-.8914851	.21181	-1.309165	-.4738051

Pr(T < t) = 0.0000 Pr(|T| > |t|) = 0.0000 Pr(T > t) = 1.0000

El resultado de la prueba de t Student fue $p= 0,0001$, por tanto, existen diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$) en los títulos de anticuerpos obtenidos mediante IFI entre individuos que recibieron tratamiento con NF, con respecto a los individuos no tratados.

Tabla 16. Comparación de medias de los títulos de anticuerpo obtenidos por IFI, en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con Nifurtimox y no tratados.

		Tratados	No tratados
IFI	MEDIA	1/320	1/640
	RANGO	NEG-1/1280	1/20-1/1280

Se observa que la media del grupo que no recibió tratamiento es superior a la del grupo tratado sólo en un título (1/640 y 1/320 respectivamente). Sin embargo 56 (56%) casos del grupo tratado se encuentran en título de 1/320 o menor, mientras que 51 (51%) de los individuos no tratados obtuvieron títulos de 1/1280.

DISCUSIÓN

Desde el punto de vista diagnóstico de laboratorio, la infección por *T. cruzi* es una entidad compleja, en la que la evolución natural determina los métodos de elección para el diagnóstico parasitológico y serológico. Sin embargo, la presencia del parásito es evidenciada principalmente en la etapa aguda de la enfermedad, teniendo en la etapa crónica una sensibilidad limitada, debido a que la parasitemia suele ser baja y en ocasiones indetectable. Desafortunadamente, la mayoría de los casos infectados se diagnostican en la etapa crónica. En esta fase, la herramienta que permite demostrar la infección por este parásito es principalmente, la determinación de anticuerpos IgG anti *T. cruzi* específicos (Flores-Chavez *et al.*, 2010). Existen dos grupos de pruebas para la detección de anticuerpos anti *T. cruzi*: las pruebas convencionales, en las que el antígeno puede ser el parásito completo o extractos solubles (ELISA, IFI y HAI) y las pruebas serológicas no convencionales que utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (WHO, 2002).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, la confirmación de laboratorio ante una sospecha clínica de ECh crónica se basa en los resultados concordantes de al menos dos técnicas inmunológicas de principios y antígenos distintos (WHO, 2002).

En los inicios del tratamiento con NF y BZ, se describen diferentes comportamientos según la etapa de la infección. Mientras que en la etapa aguda era reconocida la cura, con negativización tanto en pruebas parasitológicas como serológicas. En la etapa crónica se describen dos comportamientos: individuos en los que el xenodiagnóstico resultó positivo, indicando persistencia de la infección y el consecuente fracaso terapéutico, y, otro grupo, en que los xenodiagnósticos resultaban negativos en forma reiterada. Sin embargo, ambos grupos mantenían serología positiva (Rassi y Luquetti, 2007; Luquetti y Rassi, 2009).

Así mismo, De Lana y Martins-Filho (2015), señalan que, a pesar de los numerosos estudios realizados para evaluar las distintas pruebas de detección de anticuerpos anti *T. cruzi*, todavía en la etapa crónica no existe consenso sobre los criterios que debe cumplir el

individuo para considerar eficaz el tratamiento, debido a que los resultados obtenidos hasta el momento han sido controversiales y poco convincentes.

Algunos autores estiman que para determinar el éxito quimioterapéutico de NF post-terapia, el individuo debería negativizar tanto las pruebas serológicas (convencionales y no convencionales) como parasitológicas (De Lana y Martins-Filho, 2015)

La heterogeneidad en los criterios de eficacia entre diversos autores, se explicaría por la variación en los años de seguimiento, desde seis meses (Solari *et al*, 1998), a 24 años (Streiger *et al.*, 2004); sumado a la diversidad de métodos diagnósticos utilizados, como PCR convencional (Solari, 1998; 2001), ELISA (Streiger, 2004; Fabbro, 2007), IFI (Gallerano *et al*, 1991; Coura *et al.*, 1997) y xenodiagnóstico (Cerisola *et al.*, 1977).

En la literatura médica se describe que existe relación directa entre los métodos diagnósticos utilizados y la probabilidad de detectar la infección por *T. cruzi*, debido a que la conversión serológica (no detección de anticuerpos contra *T. cruzi*) demora años o décadas en ocurrir luego de terminado el tratamiento (Bern *et al.*, 2007).

Otra variable a considerar, es la posibilidad de re-infección de casos tratados. Ninguno de los estudios mencionados describe la ubicación geográfica de los participantes en relación a la situación vectorial de las áreas endémicas de procedencia; sin embargo, en los estudios de Solari (1998 y 2001) se puede asumir que no existió riesgo de re-infección ya que el grupo de estudio procede de un país declarado libre de la transmisión vectorial de la enfermedad (WHO, 2000). En el presente estudio, se podría inferir que el riesgo de re-infección por transmisión vectorial es mínimo, puesto que en el área de estudio, se describen intrusiones ocasionales de *T. infestans* y *M. spinolai*, no correspondiendo a colonización (Parra, 2016)¹.

La gran mayoría de los individuos con ECh se infecta durante la niñez, por lo general antes de los 10 años y, con el paso de los años la respuesta inmune humoral se vuelve más lenta, posiblemente por el largo tiempo de convivencia con el parásito (Montiel y Díaz, 2002). En casos de ECh crónica reciente, se han evidenciado tiempos de negativización serológica

¹ Parra, A. 2016. [Comunicación Personal]. MINSAL

post-terapia promedio de entre 10 a 20 años, existiendo casos donde no se alcanza jamás la seroconversión (Apt, 2011).

Estudios en ratones experimentalmente infectados con *T. cruzi*, posteriormente tratados y considerados curados, no se detectaron parásitos ni antígenos de *T. cruzi*. Las células CD8 de memoria central mantuvieron la serología positiva por más de un año (Bustamante *et al.*, 2008). No se sabe si este proceso es semejante en los seres humanos, pero si así fuera, la cura en los casos crónicos se podría alcanzar sin seroconversión (Apt, 2011).

La idea que la enfermedad de Chagas crónica no tiene tratamiento y la poca claridad en el establecimiento de los criterios de cura, produjo escasa producción y comercialización de tripanocidas, lo que impidió que Chile y el resto de Latinoamérica tuviera acceso y disponibilidad de los dos fármacos aprobados para el tratamiento de la infección (Apt *et al.*, 2008).

Desde que existe el consenso, cada vez más creciente, que el daño de la etapa crónica está directamente relacionado con la presencia del parásito y que éste se puede eliminar persistiendo los anticuerpos positivos debido a una memoria inmunológica, han aumentado los casos debido a notificación obligatoria y al tamizaje para *T. cruzi* en los bancos de sangre, esta enfermedad ha sido considerada re-emergente en nuestro país (Apt, 2008).

Paralelamente, el seguimiento de individuos en la fase crónica ha demostrado que el nivel de anticuerpos, se mantiene constante si no se había recibido tratamiento tripanocida. Por el contrario, los que se han tratado son los que presentan resultados discordantes después de algunos años (Luquetti y Rassi, 2009).

Luquetti y Rassi (2002) propusieron realizar exámenes serológicos seriados a los infectados, que por lo general tienen títulos elevados de anticuerpos; del orden de 1/640 o más en IFI y 1/1280 o más en la HAI. Con ELISA, en general se obtienen densidades ópticas mayores del doble del punto de corte. Un 10 a 15% de los infectados presentan, antes del tratamiento, títulos más bajos, de 1/160 en la IFI, 1/16 en la HAI y ELISA con D.O entre 1,5 y 2,0 veces la DO del punto de corte. En ellos, se recomienda guardar la primera muestra de suero, para poder comparar año a año las modificaciones en la

concentración de anticuerpos. En estos casos, si al inicio la IFI era de 1/160, y años posteriores se obtenía un resultado de 1/80, a pesar de no tener significancia clínica en el individuo, habla de una caída en títulos de anticuerpos, y podríamos inferir entonces que el mismo debe presentar en un futuro lejano una IFI de 1/20 o menor. Ocasionalmente, la HAI puede ser negativa antes del tratamiento, es por esto que el seguimiento debe ser realizado con IFI y ELISA.

En el presente estudio, se evaluó la respuesta serológica en individuos con ECh crónica tratados con NF, con respecto a 100 individuos no tratados, utilizando las técnicas recomendadas: ELISA e IFI (con un seguimiento post terapia promedio de 6,6 años). Se obtuvo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en ambas pruebas: $p = 0,0003$ y $p = 0,0001$, respectivamente. Lo que confirma que existe una menor concentración de IgG en individuos tratados con NF.

En ELISA se utilizó el *kit* comercial ELISA BIOS ChileChagas III, debido a su bajo costo y fácil aplicación. Además, utiliza extractos totales de *T. cruzi*, por lo tanto es más sensible respecto a otras técnicas que utilizan proteínas recombinantes, dado que sólo es capaz de detectar IgG (BIOS Chile, 2013), siendo el mayormente utilizado en Bancos de Sangre y Laboratorios en Chile.

Los resultados indicaron que existen 68 (68%) infectados no tratados en que la DO se encuentra sobre 1,807 nm, mientras que 68 (68%) de los individuos tratados con NF se encuentran en un rango inferior.

En el caso de IFI, es una técnica restringida a laboratorios de investigación y centros de referencia, puesto que, si bien es de fácil manejo y estandarización, su lectura e interpretación son un punto crítico en el análisis, dado que requieren de amplia experiencia.

Respecto a sus resultados, 51 (51%) casos del grupo no tratado, se encuentran en el último punto de corte de las diluciones (1/1280), versus 25 (25%) de los que recibieron NF. También se puede observar que un individuo tratado resultó negativo en su prueba de IFI, lo que sería concordante con su resultado de ELISA, la cual se encontraba cercana al punto de corte.

Uno de los casos pertenecientes al grupo no tratado (individuo 3868), dio resultados cercanos al punto de corte, tanto en ELISA como en IFI (0,520 y 1/20, respectivamente). Esto, podría ser explicado por una seronegativización espontánea, que como describe Sguassero (2015), ocurre en alrededor de un 3% de los casos no tratados. Este fenómeno podría estar relacionado con una respuesta inmune eficiente, obteniendo así una “cura espontanea”.

Por lo tanto, en este estudio, la evolución de los resultados serológicos en sujetos con infección crónica por *T. cruzi* que recibieron tratamiento con NF fue favorable.

En suma, para comprobar la cura, que implica negativizar la serología, es necesario esperar plazos variables, debido a que depende de distintos factores, como: tiempo en que el infectado estuvo en contacto con el parásito, fase en la cual se realizó al tratamiento y duración de este (Sguassero *et al.*, 2015). Es así como, en la fase aguda, la seronegativización puede ocurrir en un periodo de hasta 5 años y en la fase crónica reciente, en que hubo una convivencia de 10 años con el parásito, un plazo un poco mayor (5-10 años). Por otro lado, los individuos con ECh crónica, con convivencia de más de 20 años con el parásito, requieren un tiempo adicional para seronegativizar. Así, es correcto aseverar que en la fase crónica, el tratamiento no consigue negativizar la serología en tiempos de observación cortos, pero, finalmente, es solamente una cuestión de seguimiento. Si observáramos el paciente por el tiempo necesario (muchos años), muy probablemente podríamos observar la negativización de la serología (Luquetti y Rassi, 2009).

A partir de la evidencia existente, es imperativo reevaluar los criterios actuales de cura, debido a que generan discrepancia sobre la eficacia quimioterapéutica del tratamiento con NF en la ECh. Esto debiera llevar a generar cambios necesarios en la práctica clínica, considerando la reticencia actual de los médicos a recetar el fármaco, por los frecuentes efectos indeseables que provoca (náuseas, vómitos, eritema, entre otros), los prolongados tiempos de terapia (al menos 60 días), y lo más preocupante: al no existir mejores estrategias terapéuticas, muchos individuos infectados crónicos quedan sin tratamiento.

Esta Memoria de Título pretende aportar conocimientos respecto a la actual quimio eficacia del tratamiento usado actualmente en Chile para la ECh crónica, enriqueciendo la discusión sobre el significado y concepto de respuesta favorable a tratamiento. Los resultados

obtenidos pueden dar pie inicial para investigar la reactividad serológica de individuos chagásicos crónicos en el transcurso de los años y por lo tanto; evaluar la eficacia y respuesta al tratamiento en pacientes que actualmente por su condición, tienen un pronóstico incierto frente a la quimioterapia.

CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en el presente estudio, se confirma la hipótesis inicial. Los títulos de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en individuos con ECh crónica tratados con NF, son estadísticamente significativamente menores a los que circulan en individuos con ECh crónica no tratados (DO ELISA $p= 0,0003$, IFI; $p= 0,0001$; con nivel de significancia estadística $p<0,05$) evaluado en seguimiento prolongado (6,6 años promedio), constituyendo evidencia de eficacia quimioterapéutica, criterio que debería ser considerado en protocolos de tratamiento.

En el caso del test de ELISA, el kit utilizado, Test ELISACHagas III Grupo Bios, es adecuado para analizar un gran número de muestras de suero en poco tiempo, siendo el mayoritariamente utilizado en Laboratorios Clínicos y en tamizaje en Bancos de Sangre del país. Por otra parte, la técnica de IFI presenta una limitación a la hora de su aplicación rutinaria, pues depende de la experiencia técnica del operador que realiza la lectura en el microscopio de fluorescencia. Por eso, su uso como prueba de confirmación se restringe a centros de referencias y laboratorios de investigación.

A la luz de las evidencias, es necesario crear nuevos marcadores, para prever el éxito del tratamiento en el seguimiento a corto plazo.

La ECh en su etapa crónica, hoy puede y debe ser tratada con los criterios de inclusión vigentes y las herramientas disponibles para la evaluación de eficacia quimioterapéutica.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) **ANDRADE, A.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R.; SILVA, S.; LUQUETTI, A.; TRAVASSOS, L.; ALMEIDA, I.; ANDRADE, S.; ANDRADE, J.; MARTELLI, C.** 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*. 348: 1407-1413.
- 2) **APT, W.** 2011. Estado actual en el Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev. Méd. Chil* 139 (2): 247-257.
- 3) **APT, W.; HEITMANN, I.; JERICIC, I.; JOFRÉ, L.; MUÑOZ, P.; SAN MARTÍN, A.; SAPUNAR, J.; TORRES, M.; ZULANTAY, I.** 2008. Guías clínicas de la enfermedad de Chagas 2006: Parte V. Diagnóstico de laboratorio. *Rev Chil Infectol*. 25 (5): 379-383.
- 4) **ASTORGA, B.; LORCA, M.; THIERMANN, E.** 1988. Determinación de la reacción de Inmunofluorescencia Indirecta para la enfermedad de Chagas en Chile. *Parasitol latinoam*. 12: 132-135.
- 5) **BERN, C.; MONTGOMERY, S.; HERWALDT, B.; RASSI, A.; MARINNIETO, J.; DANTAS, R.** 2007. Evaluation of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 298: 2171-2181.
- 6) **BIOSCHILE.** 2003. Informe de evaluación “Comparación 4 test comerciales de ELISA para Chagas”. [en línea] <http://www.chagas.cl/3_evaluaciones/est_comp_esp.pdf> [Consulta: 01- 02- 2018].
- 7) **BOTTO, C.** 2012. Ciclo Silvestre de la enfermedad de Chagas. [en línea] <<http://www.uchile.cl/noticias/79613/nuestras-investigaciones-ciclo-silvestre-de-la-enfermedad-de-chagas>> [Consulta: 25-10-2017].
- 8) **BUSTAMANTE, J.; BIXBY, L.; TARLETON, L.** 2008. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. *NatMed.*;14: 542–550.
- 9) **CABELLO, C.; CABELLO, F.** 2008. Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. *Med Chile* 136: 385-93.
- 10) **CERSIOLA, J.; NEVES DA SILVA, N.; PRATA, A.; SCHENONE, H.; ROHWEDDER, R.** 1977. Evaluation of efficacy of Nifurtimox in chronic human Chagasic infection by using xenodiagnosis. *Bol Chil Parasitol*. 32: 51-62.

- 11) **COURA, J.; ABREAU, L.; WILLCOX, H.; PETANA, W.** 1997. Comparative controlled study on the use of benznidazole, Nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a yield area with interrupted transmission. I preliminary evaluation. *Soc Bras Med Trop.* 30: 139-144.
- 12) **DE LANA, M.; MARTINS-FILHO, O.** 2015. Revisiting the post therapeutic cure criterion in Chagas disease: Time for new methods, more questions, doubts, and polemics or time to change old concepts? *Biomed Res Int* 652985: 1-10.
- 13) **FABBRO D.; STREIGER, M.; ARIAS, E.; BIZAI, M.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N.** 2007. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Soc Bras Med Trop.* 40: 1-10
- 14) **FARFAN, A.; CASTELLANOS, Y.; LUNA, K.; ANGULO, V.** 2013. Concordancia de dos pruebas serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Sal Públ* 15 (2): 208-209.
- 15) **FLORES-CHAVÉZ, M.; CRUZ, I.; RODRIGUEZ, M.; NIETO, J.; FRANCO, E.; GARATE, T.; CAÑAVATE, C.** 2010. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 28 (5):284-293
- 16) **FUENZALIDA, F.** 2014. Registro de enfermedad de Chagas, aportes y desafíos. Ministerio de Salud (MINSAL) [en línea]
<<http://web.minsal.cl/sites/default/files/files/Presentaci%C3%B3n%20Chagas%20Arica%202014.pdf>>[Consulta: 22-04-2016]
- 17) **GALLERANO, R.; MARR, J.; SOSA, R.** 1991. Therapeutic efficacy of allopurinol in patient with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 43: 159-166.
- 18) **INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA (ISP).** 2014. Circular de Vigilancia de Enfermedad de Chagas [en línea]
<[http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/04/Circular-%20B51%2017%20Chagas%20\(2\)%20actualizada.pdf](http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2010/04/Circular-%20B51%2017%20Chagas%20(2)%20actualizada.pdf)>[Consulta: 22-04-2016].

- 19) **LORCA, M.; THIERMAN, E.; ASTORGA, B.** 1990. Técnicas de Elisa IgG en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas II: Evaluación Diagnóstica del método. *Parasitol latinoam.* 14:3-9.
- 20) **LUQUETTI, A.; RASSI.** 2009. Perspectiva del uso de la serología (Ag naturales y otros) en la evaluación de la eficacia del tratamiento etiológico [en línea] <<http://www.fac.org.ar/fec/chagas2/llave/c003/luque.htm>> [Consulta: 22-04-2016].
- 21) **MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2011. Guía Clínica “Guía de Diagnóstico, Tratamiento y Prevención de la Enfermedad de Chagas”. Santiago, Chile. 37pp.
- 22) **MONTIEL, G.; DÍAZ, G.** 2002. Respuesta inmune de las células del hospedero a la infección por *Trypanosoma cruzi*. *Rev Hosp Nac Niños.* 37: 57-63.
- 23) **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2016. La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [en línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>> [Consulta: 22-04-2016].
- 24) **RASSI, A.; LUQUETTI, A.** 2007. Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human cronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 76 (1):58-61.
- 25) **SGUASSERO, Y.; CUESTA, C.; ROBERTS, K.; HICKS, E.; COMANDE, D.; CIAPONI, A.; SOSA, S.** 2015. Course of Chronic *Trypanosoma cruzi* infection after treatment based on parasitological and serological test: A systematic review of follow- up studies. *Plos One:* 10: 1-23.
- 26) **SOLARI, A.; CONTRERAS, M.; LORCA, M.; GARCÍA, A.; SALINAS, P.; ORTIZ, S.** 1998. Yield of xenodiagnosis and PCR in the evaluation of specific chemotherapy of Chagas’ disease in children. *Bol Chil Parasitol.* 53: 27-30.
- 27) **SOLARI, A.; ORTIZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, R.; CONTRERAS, M.** 2001. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with Nifurtimox: 3 years follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother.* 48:515-519.
- 28) **SOSA, E.; SEGURA, E.; RUIZ, A.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B.; YAMPOTIS, C.** 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 59(4): 526-529.

- 29) **STREIGER, M.; FABBRO, D.; ARIAS, E.; AMICONE, N.** 2004. Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*; 37: 365-75.
- 30) **TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N.** 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev Méd Chile*, 139(2), 258-266.
- 31) **URIBARREN, T.** 2016. Enfermedad de Chagas. [En línea] <<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/trypanosomosis.html>> [Consulta: 22-04-2016].
- 32) **VALENCIA, C; MANCILLA, M; RAMOS, D.; ZULANTAY, I; MOLINA, M.; TORRES, A.; CORRAL, G.; APT, W.** 2012. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica en Chile: Efectos adversos de Nifurtimox. *Rev Ibero-Latinoam. Parasitol* 71(1): 97-108.
- 33) **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2000. WHO Chagas' disease interrupted in Chile. *TDR news*. 61: 10p.
- 34) **WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2002. Control of Chagas disease. [En línea] <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/42443>> [Consulta: 26-10-2017]

ANEXOS

Anexo 1. Acta Aprobación Proyecto de Investigación en seres humanos Fondecyt 1161485



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

1/2



ACTA DE APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN SERES HUMANOS

24 MAYO 2016

Con fecha 24 de mayo de 2016, el Comité de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile, integrado por los siguientes miembros:

Dr. Manuel Oyarzún G., Médico Neumólogo, Presidente
Prof. Gina Raineri B., Abogado y Enfermera-Matrona, Mg. Bioética, Secretaria Ejecutiva
Dr. Hugo Amigo C., Ph. D., Especialista en Salud Pública
Dra. Lucía Cifuentes O., Médico Genetista
Sra. Claudia Marshall F., Educadora, Representante de la comunidad
Dra. Grisel Orellana, Médico Neuropsiquiatra
Prof. Julieta González B., Bióloga Celular
Dra. María Angela Delucchi Bicocchi, Médico Pediatra Nefrólogo.
Dr. Miguel O'Ryan, Médico Infectólogo (miembro suplente)

Ha revisado el Proyecto de Investigación titulado: **"THE PERSISTENT NEGATIVIZATION OF PARASITEMIA IN PROLONGED FOLLOW-UP IS A BIOMARKER PREDICTIVE OF CURE IN THE TREATMENT OF CHRONIC CHAGAS DISEASE. END-POINT STUDY NINE YEARS AFTER INTERVENTION WITH NIFURTIMOX"** y cuyo investigador responsable es la **Dra. Inés Zulantay**, quien desempeña funciones en el **Laboratorio de Parasitología Básico Clínico, Programa de Biología Celular y Molecular I.C.B.M** de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El Comité revisó los siguientes documentos del estudio:

- Proyecto de investigación in extenso.
- CV del investigador responsable y de los Co-investigadores.
- Carta de aceptación de las autoridades de las instituciones en que se realizará el estudio.
- Consentimiento Informado versión 1.2, Final, 03 de diciembre de 2015.
- Carta compromiso del investigador para comunicar los resultados del estudio una vez finalizado éste.

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

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

- a) Carácter de la población estudiada: No cautiva, no terapéutica.
- b) Utilidad del Proyecto: Demostración de efectividad de tratamiento.
- c) Riesgos y Beneficios: Mínimo riesgo
- d) Protección de los participantes (asegurada por el Consentimiento Informado): Sí.

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



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

2/2

24 MAYO 2016



- e) Notificación oportuna de reacciones adversas: No aplica.
- f) El investigador responsable se ha comprometido a entregar los resultados del estudio a este Comité al finalizar el proyecto. Sí.

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

Este comité también analizó y aprobó el correspondiente documento de Consentimiento Informado en su versión modificada recibida el 12 de Mayo del 2016, que se adjuntan firmados, fechados y timbrados por el CEISH.

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

Se extiende este documento por el periodo de un año a contar desde la fecha de aprobación prorrogable según informe de avance y seguimiento bioético.

Lugar de realización del estudio:

- Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico. Programa de Biología Celular y Molecular. Instituto de Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. Independencia 1027, Santiago, Chile.
- Localidades rurales y urbanas de las comunas de Combarbalá (Provincia de Limari) e Illapel, Salamanca, Los Vilos y Canela (Provincia de Choapa).

Santiago, 24 de mayo de 2016.


Prof. Gina Raineri B.
Secretaria Ejecutiva CEISH

GRB/mfp.
c.c: - Archivo Proyecto N° 012 -2016.
- Acta N° 005.

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

Anexo 2. Consentimiento Informado Proyecto Fondecyt1161485



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



24 MAYO 2016

CONSENTIMIENTO INFORMADO

DE PARTICIPACIÓN **PROYECTO FONDECYT 1161485 (2016-2019):**

"LA PERSISTENTE NEGATIVIZACIÓN DE LA PARASITEMIA EN SEGUIMIENTO PROLONGADO, ES UN BIOMARCADOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO ANTI-PARASITARIO EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA. ESTUDIO PUNTO-FINAL, NUEVE AÑOS DESPUÉS DE INTERVENCIÓN CON NIFURTIMOX"

DE AUTORIZACIÓN **USO DE MUESTRAS TOMADAS** **ANTES-DESPUÉS DEL TRATAMIENTO (2010-2013)**

Patrocinante	Universidad de Chile
Investigador principal	Inés Zulantay Alfaro
R.U.T.	7802541-7
Institución	Universidad de Chile Facultad de Medicina Instituto Ciencias Biomédicas Programa Biología Celular-Molecular Laboratorio Parasitología Básico-Clínico
Teléfonos	229786753-229786122-229786117

Invitación a participar

Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación "**La persistente negativización de la parasitemia en seguimiento prolongado, es un biomarcador de respuesta al tratamiento anti-parasitario en la enfermedad de Chagas crónica. Estudio Punto-Final, nueve años después de la intervención con Nifurtimox**", debido a usted recibió tratamiento para la enfermedad de Chagas con este fármaco en el año 2010 y fue evaluada por nuestro equipo durante los años 2010-2013.

El estudio incluirá a un número total de **150** pacientes, procedentes de la Provincia de Choapa y Limarí, IV Región Chile (Salamanca, Illapel, Los Vilos, Canela y Combarbalá, respectivamente).

Objetivo General

24 MAYO 2016



Conocer la condición final post-terapia de pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con nifurtimox en seguimiento prolongado (9 años), a través del estudio antes de la terapia (2010) y después de la terapia (primera etapa: 2010-2013 y segunda etapa: 2016-2019).

Objetivos Específicos

1. Cuantificar la presencia de anticuerpos específicos (defensas) contra el parásito, mediante las técnicas de ELISA e IFI IgG.
2. Determinar la presencia o ausencia del parásito mediante la técnicas de PCR cualitativa y PCR Tiempo Real (ésta última permitirá conocer qué cantidad de parásitos están circulando en caso que se detecte su presencia).
3. Determinar qué tipos de parásitos tiene usted circulando en la sangre (en caso que sean detectados), mediante ensayos de genotipificación.

Procedimientos

Si Ud. acepta participar en este estudio, será sometido, por un período de 4 años (2016, 2017, 2018 y 2019), dos veces al año (en total 8 controles) a los siguientes procedimientos: un control médico-epidemiológico anual con médico parasitólogo (Dr. Werner Apt) y **dos tomas de muestra de 10 ml de sangre periférica por año.**

Riesgos

La toma de muestra de sangre venosa no tiene riesgo alguno para su salud. Cualquier efecto que Ud. considera se ha derivado de estos procedimientos, deberá comunicarlo a la Prof. Inés Zulantay, fono 229786753 o 229786122 o 229786117.

Costos

Los procedimientos del estudio no tienen costo alguno para Ud. durante el desarrollo de este proyecto.

Beneficios

Además del beneficio que este estudio significará para el progreso del conocimiento y el mejor tratamiento de futuros pacientes, su participación en este estudio le traerá los siguientes beneficios: usted será informada de los resultados del tratamiento después de nueve años de haber sido tratada, lo que está de acuerdo con los años recomendados para conocer la condición final post-terapia (Esta es una de las principales dificultades del tratamiento de la enfermedad de Chagas. La falta de adhesión de los pacientes tratados al seguimiento prolongado). Felizmente, informamos a usted que el seguimiento de tratamiento ha tenido en este estudio una excelente adhesión.

24 MAYO 2016



Alternativas

Si Ud. decide no participar en esta investigación, el punto final de seguimiento correspondería a aquellos resultados que este investigador (Prof. Inés Zulantay) le hiciera entrega personalmente en enero del año 2014. Para su conocimiento, el promedio de seguimiento en esa fecha para los 173 pacientes tratados en dicho estudio fue de 3.35 meses, lo que es considerado por la literatura insuficiente para establecer la real eficacia de un fármaco anti-parasitario en el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, tal como le fue informado.

Beneficios y riesgos de los métodos alternativos existentes

Si usted quisiera realizar los controles de seguimiento prolongado post-terapia a través de su centro hospitalario de origen, accedería, en caso que se disponga de tales técnicas y que se cuantifiquen los títulos, a los exámenes serológicos anti-*Trypanosoma cruzi* (los que detectan la defensa contra el parásito). Este procedimiento no constituye riesgo alguno para su salud. Los establecimientos de salud no disponen de las técnicas que permitan detectar y cuantificar el parásito en su sangre, como tampoco de las técnicas para tipificar el tipo de parásito que usted tiene, en caso que éste sea detectado. En caso que usted no acepte realizar el seguimiento con nuestro equipo, debería solicitar al centro hospitalario de origen, que gestione su eventual realización en las instituciones de referencia nacional (Instituto de Salud Pública).

Compensación

Si usted acepta participar del estudio y efectuarse los controles señalados, recibirá una compensación económica por gastos de locomoción que alcanzan a \$3.000 por visita. Si usted asiste a los dos controles anuales, recibirá un total de \$6.000.- Quedará constancia de ello en un recibo firmado por usted.

Garantía de seguro

Los procedimientos a los que usted será sometida(o) que corresponde a dos extracciones de sangre por año (2016-2019), no constituyen riesgo alguno para su salud. Ante cualquier complicación surgida en este procedimiento, la Dra. Inés Zulantay, investigadora principal de este estudio la llevará personalmente al Servicio de Urgencia de su centro asistencial y se hará cargo de los costos que ello implique. La Dra. Zulantay estará a cargo en forma presencial de todos los controles que a Ud. le realicen.

Confidencialidad

Toda la información derivada de su participación en este estudio será conservada en forma de estricta confidencialidad, lo que incluye el acceso de los investigadores o agencias supervisoras de la investigación. Cualquier publicación o comunicación científica de los resultados de la investigación será completamente anónima.

24 MAYO 2016



Información adicional

Usted o su médico tratante serán informados si durante el desarrollo de este estudio surgen nuevos conocimientos o complicaciones que puedan afectar su voluntad de continuar participando en la investigación.

Voluntariedad

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

Complicaciones

Es improbable que usted presente complicaciones directamente dependientes de los procedimientos realizados (extracción de sangre). No se requiere ayuno. En caso de complicación que así lo requiera, la investigadora principal de este proyecto Dra. Inés Zulantay, la llevará al Servicio de Urgencia de su centro hospitalario.

ADEMÁS,

con el fin de evaluar las muestras tomadas antes del tratamiento y en el primer período de seguimiento post-terapia, **solicitamos a usted a través de este Consentimiento Informado:**

Autorización para uso de muestras biológicas anteriores a este estudio.

Informamos a usted, que las muestras de sangre que le fueron tomadas antes del tratamiento (2010) y después del tratamiento (2010-2013), han sido resguardadas por la Investigadora Principal de este proyecto en el Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico, Facultad de Medicina Universidad de Chile. Estas muestras son muy valiosas para el presente estudio, porque nos van a permitir comparar las condiciones antes de la terapia y nueve años después (2019).

Derechos del participante

Usted recibirá una copia íntegra y escrita de este documento firmado. Al finalizar el estudio, se le entregará por escrito e informará personalmente, los resultados de la investigación, con copia a su ficha clínica. Al finalizar el proyecto, también se entregará un informe escrito a la dirección de su centro asistencial conteniendo los resultados globales. Si usted requiere cualquier otra información sobre su participación en este estudio puede comunicarse con:

Investigador

Dra. Inés Zulantay Alfaro. Fonos 229786753-229786122-229786117

Anexo 3. Análisis Mann Withney programa STATA v19 que compara si existen diferencias estadísticamente significativas en individuos con enfermedad de Chagas crónica tratados con nifurtimox en comparación a grupo no tratado.

3

t test				
1	Table Analyzed	Unpaired t test data		
2				
3	Column B	TRATADO		
4	vs.	vs.		
5	Column A	NO TRATADO		
6				
7	Mann Whitney test			
8	P value	0.0003		
9	Exact or approximate P value?	Exact		
10	P value summary	**		
11	Significantly different? (P < 0.05)	Yes		
12	One- or two-tailed P value?	Two-tailed		
13	Sum of ranks in column A,B	11658 , 9663		
14	Mann-Whitney U	3992		
15				
16	Difference between medians			
17	Median of column A	2.054		
18	Median of column B	1.747		
19	Difference: Actual	-0.3718		
20	Difference: Hodges-Lehmann	-0.3162		
21				
22				

^aPvalue; valor predictivo de P, nivel de significancia estadística (p< 0,05).