



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

**DETECCIÓN DE *Trypanosoma Cruzi* EN INDIVIDUOS ADULTOS  
CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA TRATADOS CON  
NIFURTIMOX**

**Camilo Daniel Vergara Ruiz**

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

PROFESOR GUÍA: Dr. WERNER LOUIS APT BARUCH  
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROYECTO FONDECYT 1161485

SANTIAGO, CHILE  
2019



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

**DETECCIÓN DE *Trypanosoma Cruzi* EN INDIVIDUOS ADULTOS  
CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA TRATADOS CON  
NIFURTIMOX**

**Camilo Daniel Vergara Ruiz**

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

Nota Final .....

Firma

Profesor Guía	Werner Apt Baruch	.....
Profesora Correctora	Galia Ramírez Tolosa	.....
Profesor Corrector	Eduardo Kessi Campos	.....

SANTIAGO, CHILE  
2019

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	3
Epidemiología .....	3
Patogénesis .....	4
Diagnóstico y Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	5
Tratamiento y nifurtimox .....	6
OBJETIVO GENERAL .....	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	8
MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
Población en estudio .....	9
Declaración ética .....	10
Consideraciones sobre bioseguridad .....	10
Extracción de ADN .....	10
PCR convencional .....	10
Análisis estadístico .....	11
RESULTADOS .....	12
Descripción .....	12
Análisis estadístico .....	13
DISCUSIÓN .....	14
CONCLUSIONES .....	17
PROYECCIONES.....	17
BIBLIOGRAFÍA.....	18
ANEXOS.....	25

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.** Caracterización de la población en estudio por localidad de procedencia, nivel de urbanización y sexo. .... 9

**Tabla 2.** Tabla de contingencia del total de muestras para la prueba de McNemar con distribución de  $\chi^2$ . .... 13

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Porcentaje de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, con parasitemia detectable mediante PCR convencional, en condiciones pre-terapia (Condición 1) y post-terapia (Condición 2) con nifurtimox. ....	12
---	----

## RESUMEN

La enfermedad de Chagas, una zoonosis parasitaria causada por *Trypanosoma cruzi*, representa un desafío a la salud pública en todo Latinoamérica. Se estima que 160.000 personas están infectadas en Chile, la mayoría en la etapa crónica de la enfermedad, en la cual el tratamiento farmacológico no ha tenido resultados concluyentes. Comúnmente su diagnóstico se basa en el uso de técnicas serológicas, pero los métodos de detección molecular se han posicionado como importantes herramientas para la detección de parasitemia en estudios clínicos. El objetivo de este estudio fue determinar, mediante PCR convencional, la presencia de ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica de 114 individuos adultos con enfermedad de Chagas crónica antes (Condición 1) y después (Condición 2) del tratamiento con nifurtimox. Todos los pacientes fueron diagnosticados con enfermedad de Chagas mediante IFI y ELISA. Las muestras fueron preservadas en una mezcla de Guanidina-EDTA hasta su purificación con High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). Se evaluó la pureza del ADN mediante la relación 260/280 nm en un espectrofotómetro RAY-LEIGH UV9200. Todos los ensayos de PCR se realizaron en triplicado con los primers 121 y 122 para ADN kinetoplastídico. Los productos fueron amplificados en un termociclador TC-412 (Techne) y analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%. El 84,21% (96) de las muestras en la Condición 1 fueron positivas, mientras que el 6,14% (7) de las muestras en la Condición 2 presentó parasitemia. La dística de McNemar mostró diferencias estadísticamente significativas (valor de  $p=2,2*10^{-16}$ ) en la proporción de pacientes con parasitemia detectable mediante PCR convencional entre la Condición 1 y la Condición 2. Debido a que la conversión serológica (actual criterio de cura) puede tomar muchos años, la negativización parasitológica podría ser un interesante predictor del desarrollo de la enfermedad. Resultados negativos de PCR convencional podrían sugerir acción tripanocida de nifurtimox, pero no necesariamente implica la erradicación de la infección, ya que los parásitos podrían encontrarse en una forma de desarrollo intracelular o bajo los límites de detección para PCR convencional en las muestras estudiadas.

**Palabras clave:** Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, nifurtimox, PCR.

## SUMMARY

Chagas disease, a vector-borne parasitosis caused by *Trypanosoma cruzi*, remains a major public health issue all over Latin America. It is estimated that 160,000 people are infected in Chile, most of them in the chronic phase, in which the pharmacological treatment has not been conclusive. Commonly, its diagnosis is based on serological studies, but molecular detection methods stand as useful tools for detection of parasitemia in clinical trials. The objective of this study was to determine, by conventional PCR, presence of *T. cruzi* DNA in peripheral blood samples from 114 adult individuals with chronic Chagas Disease, before (Condition 1) and after (Condition 2) treatment with nifurtimox. All patients were serologically diagnosed with Chagas Disease by IIF and ELISA. Samples were preserved in Guanidine-EDTA until DNA purification with High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics). DNA purity was assessed by the 260/280 nm ratio in a RAY-LEIGH UV9200 spectrophotometer. PCR assays were performed in triplicate, with kinetoplastidic DNA primers 121 and 122. The obtained products after amplification in a TC-412 thermocycler (Techne) were analyzed by electrophoresis in 2% agarose gel. Positive cases from Condition 1 and Condition 2 were 84.21% (96 samples) and 6.14% (7 samples), respectively. McNemar test showed statistically significant differences in proportions between Condition 1 and Condition 2 ( $p=2.2 \times 10^{-16}$ ). Since serological negative conversion (actual cure criteria) takes many years, parasitological negative conversion could be a promising predictor of the development of the disease. Negative PCR results may suggest trypanocide action of nifurtimox, but do not strictly mean that the infection was eradicated, since parasites could be in an intracellular evolutive form or under technical detectable limits for PCR in the studied samples.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, nifurtimox, PCR.

## INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) es una zoonosis causada por *Trypanosoma cruzi*, un parásito protozoo que presenta alta diversidad genética y fenotípica, clasificándose en 7 Unidades Discretas de Tipificación (DTUs), relacionadas principalmente con su distribución geográfica, características ecológicas, y patogénesis (Zingales *et al.*, 2012). Es transmitido tanto por insectos hematófagos que actúan como vectores, como por mecanismos de transmisión no vectoriales, siendo la vía congénita y las transfusiones sanguíneas las principales en zonas urbanas y en países no endémicos. Se han documentado casos de transmisión mediante trasplante de órganos o médula ósea, brotes debido a la ingesta de alimentos o líquidos contaminados e infección por accidentes de laboratorio (Rassi Jr *et al.*, 2012).

Si bien la EC fue descrita en 1909, existen antecedentes de la enfermedad miles de años antes. En la zona norte de Chile y sur de Perú se han encontrado momias pertenecientes a la cultura Chinchorro de más de 9.000 años de antigüedad con evidencia física de signos clínicos de EC, de las cuales se logró obtener muestras de ADN de *T. cruzi*. Luego de su descubrimiento, varios países en América Central y América del Sur reportaron la enfermedad entre 1913 y 1960 (Araujo-Jorge *et al.*, 2017).

En el tracto digestivo del insecto infectado, el parásito se diferencia a su forma replicativa (epimastigote) y, en la porción final del intestino, a su forma infectante (tripomastigote metacíclico). El mamífero se infecta cuando el tripomastigote metacíclico, eliminado a través de las deyecciones del vector luego de alimentarse, entra en contacto con una membrana mucosa o una injuria en la piel. La ruta oral puede darse cuando un humano o animal consume accidentalmente las deyecciones de triatomíneos infectados, alimentos contaminados con el parásito o insectos, u otros animales infectados. Dentro del hospedero, *T. cruzi* invade células del tejido subcutáneo, donde evoluciona a su forma intracelular (amastigote). Los amastigotes se replican por fisión binaria rompiendo la célula y liberando tripomastigotes que pueden pasar al torrente sanguíneo o infectar células distantes iniciando nuevos períodos de replicación. El ciclo se completa cuando el tripomastigote es ingerido por vectores triatomíneos (Rassi Jr *et al.*, 2010; Jansen *et al.*, 2017).

La fase aguda de la EC suele ser asintomática, pero cuando se presenta asociada a signos clínicos, puede incluir fiebre, inflamación del sitio de inoculación, edema palpebral unilateral (cuando el sitio de ingreso del parásito es a través de la conjuntiva ocular), linfadenopatía y hepatoesplenomegalia; un bajo porcentaje de infectados presenta manifestaciones severas como miocarditis aguda, efusión pericárdica y meningoencefalitis. Usualmente tiene resolución espontánea en un periodo de 4 a 8 semanas y el paciente evoluciona a la fase crónica. La mayoría de los infectados crónicos no manifestará síntomas, a esto se le llama la forma indeterminada de la EC. La fase crónica sintomática se desarrollará en un 30% a 40% de los individuos, usualmente 10 a 30 años luego de la infección primaria. Las principales alteraciones en esta fase son la cardiomiopatía y las megaformaciones (megacolon, megaesófago o ambos) (Rassi *et al.*, 2017).

Actualmente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) cataloga a la EC como una enfermedad tropical desatendida (WHO, 2015), se considera de gran impacto económico y sigue representando un importante desafío para la salud pública a nivel mundial, pues debido al cambio climático, al incremento en los movimientos migratorios y a las vías de transmisión no vectoriales, la enfermedad se ha diseminado a otros continentes (Pinazo y Gascon, 2015).

En los últimos años, el diagnóstico molecular con los métodos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se han convertido en herramientas clave en la detección y cuantificación de *T. cruzi* como complemento al diagnóstico serológico y seguimiento de pacientes tratados (Chatelain, 2017).

En este estudio se determinará, mediante PCR convencional (PCRc), la presencia de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica, previas y posteriores al tratamiento con nifurtimox (NF), en individuos adultos con EC crónica.

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### Epidemiología

La zona endémica de transmisión vectorial de la EC está limitada al continente americano, entre los 42° de latitud norte (Estados Unidos) y 46° de latitud sur (Patagonia Argentina), y se corresponde con la distribución de los vectores en ciclos domésticos y silvestres. *Triatoma infestans* es el vector más importante y común en América del sur (Gorla y Noireau, 2017). Chile es reconocido desde 1999 como un país en que la transmisión por *T. infestans* ha sido interrumpida (Stanaway y Roth, 2015). Tradicionalmente, la EC se ha considerado una enfermedad relacionada a la pobreza, pues se asocia a viviendas de zonas rurales y periurbanas, construidas con materiales como barro y paja, con grietas en muros y techos que confieren resguardo durante el día a los triatominos (Connors *et al.*, 2016).

La OMS estima que alrededor de 7 millones de personas se encuentran infectadas en América Latina y que un 13% la población está en riesgo de contraer la EC. La incidencia anual se encuentra cercana a las 40.000 personas, generando en torno a las 12.000 muertes anuales. En Chile, según datos entregados por la OMS durante el año 2010, la prevalencia de la infección por *T. cruzi* sería de 0,7%, con una incidencia estimada debido a transmisión vectorial del 0% (WHO, 2015). Sin embargo, ya que no existen programas de vigilancia activa de la enfermedad, y tomando en cuenta que se han reportado avistamientos de vectores en zonas domiciliarias (Canals *et al.*, 2017), estos datos podrían diferir de la realidad.

La migración de individuos en la fase crónica asintomática de la enfermedad, tanto desde zonas rurales hacia urbanas, como desde América hacia otros continentes, ha llevado a que la enfermedad se convierta en un problema de salud pública a nivel mundial, ya que, por medio de transfusiones sanguíneas, trasplantes de órganos e infección congénita, es capaz de ser transmitida en regiones no endémicas. La prevalencia de la infección en migrantes latinoamericanos en Europa se estima en 4,2%, pero se cree que el índice de subdiagnóstico de la EC está cerca del 95% (Antinori *et al.*, 2017). Los intentos por realizar estimaciones se complican, entre otros factores, por el desfase de décadas entre la infección y la fase crónica sintomática de la enfermedad, el limitado reconocimiento de muertes atribuibles a la EC, y a una ausencia casi total de información en países no endémicos (Stanaway y Roth, 2015).

## Patogénesis

Los mecanismos que generan las manifestaciones clínicas de la EC no han sido completamente comprendidos, pero parecen responder a una compleja interacción entre el hospedero y el parásito. Dos de las hipótesis más relevantes en la actualidad pretenden explicar la patogénesis de la enfermedad: la primera, supone que *T. cruzi* induce en el hospedero una respuesta inmune contra antígenos de sus propios tejidos, independiente de la persistencia del parásito en ellos; la segunda, asocia el daño producido a la persistencia de tripomastigotes en leucocitos y células del tejido subcutáneo del hospedero y a la intensa respuesta inflamatoria que desencadena especialmente en la fase aguda, pero que persiste silente en las etapas crónicas (Biolo *et al.*, 2010).

La base de la primera hipótesis descansa en la presencia de signología asociada a la enfermedad en tejidos que, aparentemente, se encuentran libres del parásito, concluyendo que la respuesta inflamatoria asociada a las lesiones no es provocada directamente por *T. cruzi*, sino por reacciones cruzadas con antígenos propios (Tarleton, 2001). Si bien la presencia de *T. cruzi* en tejidos con signos de enfermedad resulta poco evidente a través de técnicas histoquímicas, métodos de detección molecular han entregado evidencia de su persistencia en el sitio de la lesión o cerca de él. Se ha demostrado, a través de métodos de PCR e inmunohistoquímica, la existencia de asociación positiva entre miocarditis y la persistencia del parásito, o fragmentos de él, en miocardio. Además, existe evidencia de disminución en la severidad de las manifestaciones clínicas en individuos que reciben tratamientos y que disminuyen la parasitemia (Marin-Neto *et al.*, 2007; Benvenuti *et al.*, 2008). Actualmente, el rol de la respuesta autoinmune en la patogénesis de la fase crónica de la EC continúa siendo tema de debate, pero la evidencia indica que su progresión está determinada por la respuesta inflamatoria crónica debido a la persistencia de *T. cruzi* (Tarleton, 2001; De Bonna *et al.*, 2018).

La falta de comprensión de la enfermedad, y en particular de su patogénesis, y de una síntesis de las publicaciones científicas que aparentemente entran en conflicto, ha afectado la forma en que se llevan a cabo investigaciones y se desarrollan políticas públicas, además de verse reflejada en el escaso uso de tratamientos tripanocidas y en el exiguo desarrollo de nuevas alternativas de diagnóstico y farmacológicas.

## Diagnóstico y Reacción en Cadena de la Polimerasa

El algoritmo diagnóstico de la EC depende de la fase en que se encuentra el paciente. En casos de transmisión congénita de *T. cruzi* y en la fase aguda de la enfermedad, donde los métodos serológicos resultan de poca utilidad, se utilizan técnicas de diagnóstico basadas en la detección del parásito, entre ellas la técnica de PCR que presenta una mayor sensibilidad que el xenodiagnóstico, el cultivo sanguíneo y técnicas de concentración (WHO, 2002; Bua *et al.*, 2013; MINSAL, 2014).

El diagnóstico de la fase crónica se realiza fundamentalmente por medio de técnicas serológicas. El consenso general del diagnóstico en esta fase es la presencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en, al menos, dos ensayos serológicos con diferentes antígenos. Las técnicas serológicas pueden ser convencionales o no convencionales, y las más utilizadas son el ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación indirecta (HAI) y el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA). Si los resultados serológicos son discordantes, se indica la realización de un tercer ensayo, pudiendo ser de utilidad Western Blot (WB) y PCR (WHO, 2002; MINSAL, 2014; Pérez-Molina *et al.*, 2015; Luquetti y Schmuñis, 2017; Pérez-Molina y Molina, 2018).

La utilización de técnicas serológicas para el diagnóstico de la fase crónica se basa en la hipótesis de que en esta fase la parasitemia es baja e intermitente, haciendo que los métodos de diagnóstico parasitológico resulten poco fidedignos (Luquetti y Schmuñis, 2017). Sin embargo, las técnicas de detección molecular resultan de utilidad en estudios de evaluación de respuesta al tratamiento, donde la conversión negativa de la serología puede demorar muchos años (Schijman, 2018).

La sensibilidad de PCR para la detección de *T. cruzi* en infecciones crónicas es variable y, dependiendo del estudio realizado, se reportan porcentajes entre el 46 – 93,8%, y su especificidad se encuentra entre un 87 – 100% (Brasil *et al.*, 2010; Cura *et al.*, 2017; Schijman, 2018). En un estudio que comparó la eficiencia de detección de *T. cruzi* de cuatro técnicas de PCR, la que tiene como ADN blanco minicírculos de ADN kinetoplastídico y utiliza los primers 121 y 122, resultó ser la con mejor *performance* en cuanto a sensibilidad y especificidad (Seiringer *et al.*, 2017).

## **Tratamiento y nifurtimox**

Benznidazol (BZ) y NF son los únicos fármacos aprobados para el tratamiento de humanos con EC, y fueron desarrollados a principios de 1970 de manera empírica. El tratamiento con cada uno de estos fármacos comparte características comunes: mejor tolerancia en infantes, mayor eficacia en infección congénita y fase aguda de la enfermedad, disminución de la eficacia en la fase crónica y a medida que el tratamiento se aleja de la infección inicial, alto porcentaje de presentación de efectos adversos en adultos, y diferente susceptibilidad por parte de las distintas DTUs de *T. cruzi* (Bermudez *et al.*, 2016).

NF es un compuesto derivado de los nitrofuranos y, de manera similar a otros nitroheterociclos, se cree que su principal mecanismo de acción tripanocida está basado en la producción de radicales libres. Reacciones catalizadas por enzimas nitroreductasas y superóxidoreductasas generarán aniones superóxido y peróxido de hidrógeno que, en presencia de hierro, darán lugar a radicales hidroxilo de gran poder oxidativo. *T. cruzi* tiene una baja capacidad de detoxificación celular de estos compuestos en comparación a las células de vertebrados (Boiani, 2010; Bern, 2011).

Se estima que la cura parasitológica y serológica se alcanza en hasta un 98 – 100 % de los casos de infección en neonatos, y en un 70 – 75% de los pacientes en la fase aguda de la infección (Apt, 2017). En la fase crónica indeterminada, los porcentajes parecen depender de variables como la edad, localización geográfica y vía de transmisión; sin embargo, se ha reportado que el tratamiento etiológico disminuye complicaciones cardiacas y mejora el desenlace clínico de la EC (WHO, 2002; Bern, 2011). No obstante, cabe destacar que los estudios son metodológicamente heterogéneos y estas cifras presentan alta variabilidad.

El criterio clásico de cura de la fase crónica corresponde a la conversión negativa de la serología, sin embargo, esta puede tardar entre años y décadas luego del tratamiento en población adulta y, por esta razón, no representa un punto final adecuado para ensayos clínicos y evaluación de respuesta al tratamiento. La estrategia actual en este tipo de estudios es el uso de PCRc y PCR Tiempo Real (PCRq), para detectar y cuantificar la parasitemia como punto final, llevándose a cabo grandes esfuerzos por estandarizar y validar PCR para la detección de *T. cruzi* en muestras de sangre humana (Schijman *et al.*, 2011; Chatelain, 2017).

Con la finalidad de aportar información que apoye la toma de decisiones para la instauración de tratamientos tripanocidas en el quehacer clínico y que sirva de sustento para el desarrollo de políticas públicas en torno al tratamiento de la EC en las zonas consideradas endémicas del norte de Chile, este estudio buscará determinar mediante PCRc la persistencia del parásito en sangre luego del tratamiento con NF en individuos adultos con EC crónica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detectar, mediante PCR convencional, la presencia de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica, antes y después de ser tratados con nifurtimox.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar, mediante PCR convencional, la condición parasitológica de individuos adultos con enfermedad de Chagas crónica antes y después del tratamiento con nifurtimox.
2. Comparar la condición parasitológica de individuos adultos con enfermedad de Chagas crónica antes y después del tratamiento con nifurtimox.
3. Analizar el efecto del tratamiento con nifurtimox en el riesgo de presentar parasitemia detectable mediante PCR convencional en pacientes adultos con enfermedad de Chagas crónica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población en estudio

Los participantes corresponden a 114 personas con EC crónica confirmada mediante ELISA e IFI procedentes de zonas hiperendémicas rurales o urbanas ubicadas entre las latitudes 29° 02' S y 32° 16' S, provincias de Choapa (Comunas de Canela, Illapel, Salamanca y Los Vilos) y Limarí (Combarbalá), Región de Coquimbo, Chile. La edad de los pacientes osciló entre los 20 y los 73 años, con una edad promedio de 43,1 años. Cada uno de los pacientes fue tratado con NF luego de cumplida la mayoría de edad. La terapia fue iniciada entre enero de 2009 y mayo de 2012, y finalizó entre marzo de 2009 y julio de 2012. Todos los individuos cuentan con una muestra de sangre periférica previa al inicio del tratamiento.

La información epidemiológica fue recogida por personal del Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La caracterización de la población en estudio se detalla en la Tabla 1. Las muestras de sangre periférica posteriores al tratamiento fueron recolectadas durante los días 21 y 29 de enero del año 2017 en los centros de salud de las comunas anteriormente especificadas. El periodo de seguimiento a la fecha del control es de entre 5,6 y 9 años, con un promedio de 7,3 años.

**Tabla 1.** Caracterización de la población en estudio por localidad de procedencia, nivel de urbanización y sexo.

PROCEDENCIA					URBANIZACIÓN		SEXO	
Canela	Combarbalá	Illapel	Los Vilos	Salamanca	Rural	Urbano	Masculino	Femenino
14	15	32	9	44	36	78	23	91

Las muestras de pacientes con EC crónica fueron distribuidas en dos grupos descritos a continuación:

- **Condición 1:** 114 muestras previas al tratamiento con NF, una de cada paciente.
- **Condición 2:** 114 muestras posteriores al tratamiento con NF, una de cada paciente.

## **Declaración ética**

La participación de los pacientes se encuentra bajo Consentimiento Informado (Anexo 1), entregado de manera escrita, y aprobado por el Servicio de Salud de Coquimbo y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile (Protocolos No. 048-11 y No. 012-16) (Anexo 2).

## **Consideraciones sobre bioseguridad**

El proyecto Fondecyt Regular N° 1161485 se encuentra aprobado por la Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, que certifica el cumplimiento de los requerimientos y exigencias de bioseguridad necesarias para ser desarrollado (Anexo 3).

## **Extracción de ADN**

Se mezclaron 5 mL de sangre venosa de cada paciente con el mismo volumen de una solución 6 M de hidrocloreto de guanidina y 0,2 M de EDTA a pH 8,0, se incubaron a 98°C durante 15 minutos y luego se mantuvieron a 4°C (Wincker *et al.*, 1994). La extracción de ADN se realizó a una alícuota de 200 µL de la mezcla, usando el High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se mantuvo a -20°C hasta ser utilizado. La pureza del ADN fue evaluada mediante la relación 260/280 nm, en un espectrofotómetro RAY-LEIGH UV9200, y fueron aceptados valores desde 1,8 hasta 2,0 (Thatcher, 2018).

## **PCR convencional**

El PCRc se realizó en triplicado utilizando los oligonucleótidos 121 y 122 que reconocen cuatro regiones altamente conservadas en cepas de gran diversidad biológica y que están presentes en los minicírculos de *T. cruzi*, para obtener un producto de amplificación de 330 pb especie específico para *T. cruzi* (Degrave *et al.*, 1989; Sturm *et al.*, 1988). Cada muestra fue estudiada en un volumen final de 20 µL, incluyendo 5 µL del extracto de ADN. Las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 µM de cada primer, y 1 unidad GoTaq DNA polymerase (Promega Corp., USA). El programa de amplificación, realizado en un termociclador TC-412 (Techne, UK),

incluye una desnaturalización a 98°C por 1 min y 64°C por 2 min; 33 ciclos a 94°C por 1 min, 64°C por 1 min y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 10 min. Cada experimento incluyó dos controles negativos: agua en sustitución del ADN y ADN de un paciente sin EC. Como control positivo se utilizó ADN purificado de *T. cruzi* de cepa Tulahuén. Los productos de la amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y visualizados luego de realizar una tinción con RedGel (Biotium Inc.). Se incorporó una escala de 5µLBench Top 100 pb DNA ladder (Promega Corp., USA).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron analizados mediante el programa R v.3.5.1. Con la finalidad de establecer si existen diferencias estadísticamente significativas en la proporción de casos con parasitemia detectable mediante la técnica de PCRc entre la Condición 1 y la Condición 2 atribuibles al tratamiento con NF, los resultados fueron evaluados utilizando la prueba de McNemar basado en la distribución de  $\chi^2$ , considerando un error de 0,05.

Finalmente, se calcularon los valores de tasa de evento en grupo control (CER) y grupo experimental (EER), riesgo relativo (RR), reducción absoluta de riesgo (ARR), número necesario a tratar (NNT) y reducción relativa de riesgo (RRR), con la finalidad de evaluar la relevancia del tratamiento con NF en la negativización parasitológica en la población en estudio. Los valores se obtuvieron siguiendo los métodos descritos por Canals (2007).

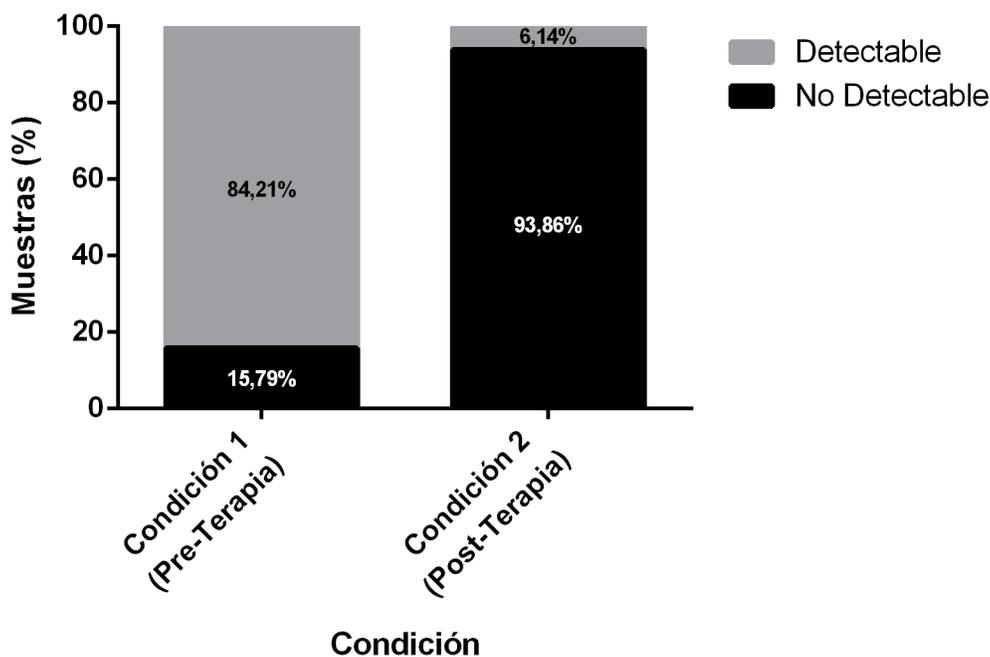
## RESULTADOS

### Descripción

Los resultados obtenidos para la Condición 1 y la Condición 2 se muestran en el Anexo 4.

En un 84,21 % de las muestras (96) pertenecientes a la Condición 1 se encontraron niveles detectables de ADN kinetoplastídico de *T. cruzi*, mientras que el 15,79 % (18) restante presentó parasitemia negativa. En la Condición 2 fue posible detectar parasitemia en un 6,14 % de las muestras (7), y el porcentaje de casos negativos ascendió a 93,86 % (107). Los resultados se muestran en la Figura 1.

Seis (5,26 %) individuos positivos en la Condición 1 mantuvieron la parasitemia en la Condición 2. Diecisiete (14,91 %) casos negativos en la Condición 1 continúan siendo negativos en la Condición 2. Por otro lado, un (0,88 %) paciente en la Condición 1 en que no se evidencia parasitemia, presenta parasitemia en la Condición 2.



**Figura 1.** Porcentaje de pacientes con enfermedad de Chagas crónica, con parasitemia detectable mediante PCR convencional, en condiciones pre-terapia (Condición 1) y post-terapia (Condición 2) con nifurtimox.

## Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en los PCRc fueron ordenados en una tabla de contingencia (Tabla 2) y se les aplicó la prueba no paramétrica de McNemar basada en la distribución de  $\chi^2$  con un nivel de significación de 0,05. Se obtuvo un valor de  $p=2,2*10^{-16}$ , siendo  $p<0,05$ , por lo tanto, existen diferencias estadísticamente significativas en la proporción de individuos con parasitemia detectable mediante PCRc entre la Condición 1 y la Condición 2, luego del tratamiento con NF.

**Tabla 2.** Tabla de contingencia del total de muestras para la prueba de McNemar con distribución de  $\chi^2$ .

	CONDICIÓN 2		TOTAL
	Positivo	Negativo	
CONDICIÓN 1			
Positivo	6	90	96
Negativo	1	17	18
TOTAL	7	107	114

Los valores calculados para evaluar la importancia del tratamiento con NF indican lo siguiente:

- El riesgo absoluto de presentar parasitemia detectable mediante PCRc en individuos pertenecientes a la Condición 1 es de un 84% (CER=0,84).
- Mientras que el riesgo absoluto de presentar parasitemia detectable mediante PCRc en individuos pertenecientes a la Condición 2 es de un 6% (EER=0,06).
- El valor del riesgo relativo obtenido fue de RR=0,7, lo que indica que el tratamiento con NF reduciría el riesgo de presentar parasitemia detectable mediante PCRc.
- El 78% de los individuos tratados con NF podría alcanzar la negativización parasitológica (AAR=0,78).
- El número necesario de individuos a tratar con NF para beneficiar a uno con la negativización parasitológica es de 1,28 (NNT = 1,28).
- Finalmente, el valor obtenido para la reducción relativa del riesgo (RRR = 0,93) indica que el tratamiento con NF reduce en un 93% el riesgo de presentar parasitemia detectable mediante PCRc.

## DISCUSIÓN

La finalidad de comparar la condición parasitológica de individuos antes y después de recibir el tratamiento con NF fue revelar diferencias estadísticamente significativas en las proporciones de parasitemia detectables mediante PCRc.

Con el objetivo de conseguir resultados fidedignos y reproducibles al momento de detectar parasitemia a través de PCRc se usó una técnica que presenta alta sensibilidad y especificidad, utilizando los primers 121 y 122, que tienen como blanco ADN kinetoplastídico conservado en distintas cepas de *T. cruzi* (Seiringer *et al.*, 2017). Además, luego de la extracción del ADN fue medida la relación 260/280 nm mediante absorbancia ultravioleta que, si bien no diferencia entre ADN humano y ADN del parásito, ni entre ADN íntegro y ADN degradado, nos entrega una aproximación a la pureza de la muestra (Thatcher, 2018). A pesar de que todas las muestras utilizadas en el estudio están expuestas a factores que generan riesgo de degradar los ácidos nucleicos, es debido a que las muestras pertenecientes a la Condición 1 tienen una antigüedad mayor a 7 años, y han sido utilizadas en diversos estudios, que se debe tener en cuenta la posibilidad de que, del 15,79% de muestras que no presentaron parasitemia, exista un porcentaje cuyo resultado negativo se deba a degradación del ADN (Fernández y Ulloa, 2017). Finalmente, para cada muestra se realizó PCRc en triplicado con la finalidad de evitar resultados que indujeran a confusión. No se incluyeron ensayos con *Leishmania* spp. o *Trypanosoma rangeli*, ya que, a pesar de ser enfermedades relacionadas, están ausentes en Chile (Solari *et al.*, 2001; Cura *et al.*, 2017). Además, la posibilidad de una amplificación eficiente de material genético de *T. rangeli* es remota, ya que los primers 121 y 122 presentan desajustes entre las regiones blanco y su extremo 3' (Brasil *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran un alto porcentaje de conversión negativa de la parasitemia, 93,86% de resultados de PCRc negativos en el grupo de individuos tratados, lo que se asemeja a lo descrito en la literatura. En Suiza, de 37 migrantes latinoamericanos con EC crónica que fueron tratados con NF y evaluados 3 años después, todos obtuvieron resultados negativos de PCRc, sin embargo, 1 (2,7%) reflejó la presencia de parasitemia en PCRq (Jackson *et al.*, 2013). Un estudio realizado en Brasil en individuos con EC crónica tratados con NF o BZ demostró que el 64,6% de los pacientes

(31 de 48) tenía resultados negativos de PCRc en un seguimiento promedio de 20 años (Britto *et al.*, 2001). Por otra parte, de 29 personas con EC crónica que completaron satisfactoriamente un tratamiento con BZ, un 48,3% no mostró amplificación de ADN de *T. cruzi* mediante PCR en el seguimiento, mientras que un 10,3% de las muestras estudiadas fue considerada no concluyente (Aguilar *et al.*, 2012). Murcia *et al.*, demostró que 96 migrantes bolivianos con EC crónica en España lograron la conversión negativa de la parasitemia en un control 90 días posterior al tratamiento con BZ, utilizando PCRc (Murcia *et al.*, 2010). Una investigación conducida por la misma autora en España, en pacientes con EC crónica tratados con BZ, en que el periodo de seguimiento ascendió a 7 años utilizando solamente PCRc y donde la mayor cantidad de los individuos enrolados eran de nacionalidad boliviana, el 96,7% de la población estudiada se mantuvo con parasitemia no detectable a lo largo de todos los controles posteriores al tratamiento (Murcia *et al.*, 2016). Cardoso *et al.* analizaron muestras de sangre de pacientes con EC crónica utilizando PCRq: un 83,4% del grupo de individuos tratados con BZ no presentó parasitemia, en contraste con el grupo control (individuos no tratados), en el cual un 63,6% fue positivo (Cardoso *et al.*, 2018). A pesar de existir diferencias metodológicas, de protocolos de administración de medicamentos, y en los métodos de detección parasitológica de *T. cruzi* en los estudios mencionados, los resultados entregados por estas investigaciones muestran concordancia en los altos porcentajes de negativización parasitológica en pacientes con EC crónica tratados con NF o BZ.

Respecto al caso del paciente que presentó parasitemia negativa en la Condición 1 y parasitemia positiva en la Condición 2, existen casos similares descritos en la literatura científica (Murcia *et al.*, 2010). Debido a que el éxito de la técnica de PCRc depende de la carga de parásitos circulantes en el torrente sanguíneo del paciente y que *T. cruzi* circula en bajas cantidades en la fase crónica, no se puede descartar la posibilidad de un resultado falso negativo. Por otra parte, situaciones de reinfección podrían alterar la percepción de los resultados de este estudio, puesto que si bien la OMS clasifica a Chile como un país que ha interrumpido el ciclo doméstico asociado a *T. infestans*, en el cual existe una incidencia de 0 casos anuales debido a transmisión vectorial, y una población en riesgo de infección por *T. cruzi* de 0 (WHO, 2015), hay reportes excepcionales de viviendas con intrusión, pero sin colonización, de vectores infectados (Canals *et al.*, 2017). Finalmente, los pacientes

enrolados en el estudio dan cuenta de avistamientos de vinchucas dentro de las casas y en zonas peridomiciliarias (Información no publicada).

Una de las limitaciones de esta memoria es la falta de información relativa al tratamiento, pues se describe que los pacientes que no terminan el tratamiento muestran parasitemias positivas en los periodos de seguimiento (Murcia *et al.*, 2016; Murcia *et al.*, 2017). Debido a la alta frecuencia de presentación de efectos adversos con NF, que se fluctúa entre un 43% y un 97,5% (Perez-Molina y Molina, 2018), la cantidad de pacientes que interrumpe el tratamiento también es alta: entre un 14,5% y un 75,0% de quienes inician el tratamiento no lo terminan, principalmente debido a la aparición de anorexia que lleva a pérdida de peso, cambios de ánimo, desórdenes del sueño, náuseas, vómito, y sarpullido, entre otros síntomas (Fabbro *et al.*, 2007; Jackson *et al.*, 2010; Perez-Molina y Molina, 2018). En un estudio conducido en 60 pacientes chilenos tratados con NF en dosis de 10 mg/kg/día, durante 60 días, 49 (81,67%) presentaron efectos adversos y 4 (6,67%) abandonaron el tratamiento (Valencia *et al.*, 2012). Por lo tanto, contar con una herramienta que registre el grado de cumplimiento del tratamiento en los pacientes resulta de vital importancia, debido a que puede influir en los resultados.

Finalmente, es importante señalar que las muestras con resultados negativos deben ser interpretados como parasitemias no detectables mediante PCRc y no como la ausencia de parásitos o de enfermedad, pues esta metodología podría no detectar parasitemias bajas, como las descritas en la fase crónica de la EC, ni es posible dilucidar la presencia de parásitos en tejidos (De Lana y Martins-Filho, 2015). Por esto, podría ser necesario investigar la evolución parasitológica en varios puntos de seguimiento, aplicando de manera conjunta técnicas serológicas y de detección molecular cualitativas y cuantitativas.

## **CONCLUSIONES**

- Se puede observar una diferencia estadísticamente significativa en la proporción de individuos adultos con EC crónica tratados con NF en que se detecta parasitemia por medio de PCRc en condiciones pre-terapia y 7,3 años post-terapia.
- En un 6,14% de los individuos de la población en estudio se puede apreciar que la terapia con NF no produce la eliminación del parásito en sangre y, por lo tanto, estos no alcanzan la cura parasitológica.
- El tratamiento con NF reduce el riesgo de presentar parasitemia detectable mediante PCRc en los individuos en estudio, lo que podría implicar una condición favorable en caso de que la negativización de la parasitemia se mantenga a través de varios controles.

## **PROYECCIONES**

- Con el fin de generar información de mayor utilidad para el desarrollo y evaluación de políticas públicas en torno a la EC, se hace necesario correlacionar la detección de parasitemia mediante PCRc con otros métodos de detección molecular, como PCRq, y con métodos serológicos, así como también con la evolución de los signos y síntomas asociados al curso clínico de la enfermedad.

## **BIBLIOGRAFÍA**

**AGUIAR, C.; BATISTA, A.; PAVAN, T.; ALMEIDA, E.; GUARIENTO, M.; WANDERLEY, J.; COSTA, S.** 2012. Serological profiles and evaluation of parasitemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. Trop Med Int Health. 17(3):368-373.

**ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; BIANCO, R.; GRANDE, R.; GALLI, M.; CORBELLINO, M.** 2017. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. Eur J Intern Med. 43:6-15.

**APT, W.** 2017. Treatment of Chagas disease. In: Telleira, J.; Tibayrenc, M. American Trypanosomiasis Chagas disease. 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier. pp. 751-771.

**ARAUJO-JORGE, T.; TELLEIRA, J.; DALENZ, J.R.** 2017. History of the discovery of the American Trypanosomiasis (Chagas disease). In: Telleria, J.; Tibayrenc, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier. pp. 1-22.

**BENVENUTI, L.A.; ROGGÉRIO, A.; FREITAS, H.F.; MANSUR, A.J.; FIORELLI, A.; HIGUCHI, M.L.** 2008. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. Ann Trop Med Parasitol. 102(6):481-487.

**BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J.P.; PALMA, S.** 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Trop. 156:1-16.

**BERN, C.** 2011. Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. N Engl J Med. 364(26):2527-2534.

**BIOLO, A.; RIBEIRO, A.L.; CLAUSELL, N.** 2010. Chagas Cardiomyopathy – Where Do We Stand After a Hundred Years?. Prog Cardiovasc Dis. 52:300-316.

**BOIANI, M.; PIACENZA, L.; HERNÁNDEZ, P.; BOIANI, L.; CERECETTO, H.; GONZÁLEZ, M.; DENICOLA, A.** 2010. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved?. *Biochem Pharmacol.* 79:1736-1745.

**BRASIL, P.; DE CASTRO, L.; HASSLOCHER-MORENO, A.; SANGENIS, L.; BRAGA, J.** 2010. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 10:337-354.

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

**BUA, J.; VOLTA, B.J.; PERRONE, A.E.; SCOLLO, K.; VELÁZQUEZ, E.B.; RUIZ, A.M.; DE RISSIO, A.M.; CARDONI, R.L.** 2013. How to Improve the Early Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Relationship between Validated Conventional Diagnosis and Quantitative DNA Amplification in Congenitally Infected Children. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(10):e2476.

**CANALS, M.** 2007. Curso de estadística universitaria. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. 163 p.

**CANALS, M.; GONZÁLEZ, C.; CANALS, L.; CANALS, A.; CÁCERES, D.; ALVARADO, S.; CATTAN, P.; SAAVEDRA, M.; ZULANTAY, I.; APT, W.** 2017. ¿Qué dicen los números de la evolución temporal de la enfermedad de Chagas?. *Rev Chilena Infectol.* 34(2):120-127.

**CARDOSO, C.S.; RIBEIRO, A.L.; OLIVEIRA, C.; OLIVEIRA, L.C.; FERREIRA, A.M.; BIERRENBACH, A.L.; PADILHA, J.L.; COLOSIMO, E.A.; FERREIRA, J.E.; LEE, T.; BUSCH, M.P.; REINGOLD, A.L.; SABINO, E.C.** 2018. Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study. *PLoS Negl Trop Dis.* 12(11):e0006814.

**CHATELAIN, E.** 2017. Chagas disease research and development: Is there a light at the end of the tunnel?. *Comput Struct Biotechnol J.* 15:98-103.

**CONNERS, E.E.; VINETZ, J.M.; WEEKS, J.R.; BROUWER, K.C.** 2016. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop.* 156:68-78.

**CURA, C.I.; RAMÍREZ, J.C.; RODRÍGUEZ, M.; LOPEZ-ALBÍZU, C.; IRAZU, L.; SCOLLO, K.; SOSA-ESTANI, S.** 2017. Comparative Study and Analytical Verification of PCR methods for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease. *J Mol Diagn.* 19(5):673-681.

**DE BONA, E.; FREITAS, K.C.; BAVIA, L.; OMIDIAN, Z.; GREMSKI, L.H.; SANDRI, T.L.; DE MESSIAS, I.J.** Autoimmunity in Chronic Chagas Disease: A Road of Multiple Pathways to Cardiomyopathy. 2018. *Front Immunol.* 9:e01842.

**DE LANA, M.; MARTINS-FILHO, O.A.** 2015. Revisiting the Posttherapeutic Cure Criterion in Chagas Disease: Time for New Methods, More Questions, Doubts, and Polemics or Time to Change Old Concepts?. *BioMed Res Int.* 2015:e652985.

**DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S.P.; BRITTO, C.; VAN HEUVERSWYN, H.; KIDANE, G.Z.; CARDOSO, M.A.; MUELLER, R; SIMPSON, L.; MOREL, C.** 1988. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 27:63-70.

**FABBRO, D.L.; STREIGER, M.L.; ARIAS, E.D.; BIZAI, M.L.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N.A.** 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. *Rev Soc Bras Med Trop.* 40(1):1-10.

**FERNÁNDEZ, J.; ULLOA, S.** 2017. Recomendaciones para laboratorios que realizan la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): áreas y flujos de trabajo. Instituto de Salud Pública. Santiago, Chile. 11 p.

**GORLA, D.; NOIREAU, F.** 2017. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. *In:* Telleria, J.; Tibayrenc, M. *American Trypanosomiasis Chagas Disease.* 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier. pp. 197-221.

**JANSEN, A.M.; ROQUE, A.L.R.; XAVIER, S.C.C.** 2017. *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: general aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In: Telleria, J.; Tibayrenc, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier. pp. 265-282.

**JACKSON, Y.; ALIROL, L.; WOLFF, H.; COMBESCURE, C.; CHAPPUIS, F.** 2010. Tolerance and Safety of Nifurtimox in Patients with Chronic Chagas Disease. *Clin Infect Dis.* 51(10):69-75.

**JACKSON, Y.; CHATELAIN, E.; MAURIS, A.; HOLST, M.; MIAO, Q.; CHAPPUIS, F.; NDAO, M.** 2013. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. *BMC Infect Dis.* 13:1-6.

**LUQUETTI, A.O.; SCHMUÑIS, G.A.** 2017. Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. In: Telleria, J.; Tibayrenc, M. American Trypanosomiasis Chagas Disease. 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier. pp. 687-730.

**MARIN-NETO, J.A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B.; SIMOES, M.V.** 2007. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. *J Am Heart Assoc.* 115:1109-1123.

**MINISTERIO DE SALUD (MINSAL).** 2014. Norma General Técnica Control y Prevención de la Enfermedad de Chagas. Ministerio de Salud. Santiago, Chile. 98 p.

**MURCIA, L.; CARRILERO, B.; FERRER, F.; ROIG, M.; FRANCO, F.; SEGOVIA, M.** 2016. Success of benznidazole chemotherapy in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected patients with a sustained negative PCR result. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 35:1819-1827.

**MURCIA, L.; CARRILERO, B.; MUÑOZ, M.; IBORRA, M.; SEGOVIA, M.** 2010. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother.* 65:1759-1764.

- MURCIA, L.; SIMÓN, M.; CARRILERO, B.; ROIG, M.; SEGOVIA, M.** 2017. Treatment of Infected Women of Childbearing Age Prevents Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection by Eliminating the Parasitemia Detected by PCR. *J Infect Dis.* 215:1452-1458.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; MOLINA, I.** 2018. Chagas disease. *Lancet.* 391(10115):82-94.
- PÉREZ-MOLINA, J.A.; PÉREZ, A.M.; NORMAN, F.F.; MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.** 2015. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 15:1347-1356.
- PINAZO, M.; GASCON, J.** 2015. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop.* 151:16-20.
- RASSI, A.; DE REZENDE, J.M.; LUQUETTI, A.O.; RASSI JR, A.** 2017. Clinical phases and forms of Chagas disease. In: Telleria, J.; Tibayrenc, M. *American Trypanosomiasis Chagas Disease.* 2<sup>nd</sup> Ed. Elsevier. pp. 653-686.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A.** 2010. Chagas disease. *Lancet.* 375:1388-1402.
- RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M.** 2012. American Trypanosomiasis. *Infect Dis Clin N Am.* 26:275-291.
- SCHIJMAN, A.G.** 2018. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 184:59-66.

**SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; MEJIA, A.M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, R.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R.H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; SANCHEZ, Z.; GALVAO, L.; NOLDER, D.; MONJE, M.; LEVI, J.E.; RAMÍREZ, J.D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M.I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; DE CASTRO, A.M.; GONZALEZ, C.I.; ACOSTA, K.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.; TRIANA, C.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; SOSA, S.; DASILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J.** 2011. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis. 5(1):e931.

**SEIRINGER, P.; PRITSCH, M.; FLORES-CHAVEZ, M.; MARCHISIO, E.; HELFRICH, K.; MENGELE, C.; HOHNERLEIN, S.; BRETZEL, G.; LÖSCHER, T.; HOELSCHER, M.; BERENS-RIHA, N.** 2017. Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. Diagn Microbiol Infect Dis. 88:225-232.

**SOLARI, A.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, M.; CONTRERAS, M.; SALINAS, P.; ROJAS, A.; SCHENONE, H.** 2001. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 years follow-up by PCR. J Antimicrob Chemother. 48:515-519.

**STANAWAY, J.D.; ROTH, G.** 2015. The burden of Chagas disease. Glob Heart. 10(3):139-144.

**STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.; SIMPSON, L.** 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastminicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol. 33:205-214.

**TARLETON, R.L.** 2001. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. Int J Parasitol. 31:550-554.

**THATCHER, S.A.** 2018. Nucleic Acid Isolation. In: Rifai, N.; Horvath, A.R.; Wittwer, C.T.; Park, J. Principles and Applications of Molecular Diagnostics. Elsevier. 35-46 pp.

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

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2002. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. World Health Organization. Ciudad de Singapur, República de Singapur. 112 p. (WHO Technical Report Series 905).

**WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J.; CARDOSO, M.; OELEMANN, W.; MOREL, C.** 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg.* 51:771-777.

**WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO).** 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. [en línea]. *Wkly Epidemiol Rec.* 90(6)33-44 <<http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>> [consulta: 30-08-2017].

**ZINGALEZ, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.G.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R.** 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 12:240-253.

## ANEXOS

### Anexo 1. Consentimiento Informado.

		
UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE MEDICINA COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS		
<b><u>CONSENTIMIENTO INFORMADO</u></b>		
2 JUL 2016		
<b><u>DE PARTICIPACIÓN</u></b>		
<b>PROYECTO FONDECYT 1161485 (2016-2019):</b>		
<b>"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"</b>		
<b><u>DE AUTORIZACIÓN</u></b>		
<b>USO DE MUESTRAS TOMADAS ANTES-DESPUÉS DEL TRATAMIENTO (2010-2013)</b>		
<b>Patrocinante</b>	Universidad de Chile	
<b>Investigador principal</b>	Inés Zulantay Alfaro	
<b>R.U.T.</b>	7802541-7	
<b>Institución</b>	Universidad de Chile Facultad de Medicina Instituto Ciencias Biomédicas Programa Biología Celular-Molecular Laboratorio Parasitología Básico-Clínico	
<b>Teléfonos</b>	229786753-229786122-229786117	
<b><u>Invitación a participar</u></b>		
Le estamos invitando a participar en el proyecto de investigación " <b><i>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</i></b> ", 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 <b>150</b> pacientes, procedentes de la Provincia de Choapa y Limarí, IV Región Chile (Salamanca, Illapel, Los Vilos, Canela y Combarbalá, respectivamente).		
1		

## **Objetivo General**

12 JUL 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.

12 JUL 2016



### **Alternativas**

Si Ud. decide no participar en esta investigación, el punto final de seguimiento le 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 \$5.000 por visita. Si usted asiste a los dos controles anuales, recibirá un total de \$10.000.- 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.

12 JUL 2018



### **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 2. Acta de Aprobación.



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 Biccocchi, 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



- 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-Clínico. 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 Limarí) 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 3. Certificado de Bioseguridad.



FACULTAD DE  
**MEDICINA**  
UNIVERSIDAD DE CHILE

Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad

Santiago, 03 de Junio 2016.-

Señores

**Fondecyt Regular 2016, N°1161485**

#### **PRESENTE**

Estimados señores:

La Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile certifica que ha recibido del investigador responsable Dra. Inés Zulantay Alfaro, para su estudio el proyecto titulado **"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."**, Laboratorio de Parasitología Básico-Clinico, Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, el cual cumple con los requerimientos básicos de Bioseguridad para ser desarrollado, además se adecua a las exigencias establecidas por los manuales: CONICYT "Bioseguridad 1ra edición,1994" y "Manual de Normas de Bioseguridad, 2da edición 2008, Centro de Control y Prevención de Enfermedades, CDC, 4ª edición, Manual Bioseguridad en laboratorios, Organización Mundial de la Salud OMS, Ginebra 2005, por tal motivo nuestra Unidad da el visto bueno para su realización.

El investigador responsable Dra. Inés Zulantay Alfaro, se compromete a cumplir con las normas de bioseguridad indicadas en los manuales antes mencionados y las establecidas en el Reglamento Interno del funcionamiento de los laboratorios, Unidad de Prevención de Riesgos y Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. En concomitancia se hace responsable de que todos los participantes del proyecto cumplan con las normas de bioseguridad establecidas.

  
Tomé conocimiento: Dra. Inés Zulantay Alfaro



  
**Profesora Mónica Acuña Patzke**  
**Directora Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad**

c.c.

- Decano, Dr. Manuel Kukuljan
- Director Instituto de Ciencias Biomédicas, Dra. Carmen Larrañaga
- Investigador responsable, Dra. Inés Zulantay Alfaro
- Archivo

Unidad de Prevención de Riesgos & Bioseguridad, Facultad de Medicina, Universidad de Chile  
Independencia # 1027 / Fono: 229786564 @jpr@med.uchile.cl

Anexo 4. Resumen de resultados por grupo.

	Grupo 1 (Pre-Terapia)		Grupo 2 (Post-Terapia)	
	ID	Resultado	ID	Resultado
001	1842	-	4209	-
002	1763	-	4210	-
003	1845	+	4211	-
004	2588	+	4212	-
005	1985	+	4214	-
006	1975	+	4215	+
007	1064	+	4216	-
008	1735	+	4218	-
009	2234	+	4219	-
010	1973	+	4220	-
011	2600	+	4221	-
012	2254	-	4222	-
013	1065	+	4223	-
014	1981	+	4224	-
015	1741	+	4225	-
016	1244	+	4227	-
017	1531	+	4228	-
018	1069	+	4230	-
019	2578	+	4231	-
020	2601	+	4232	-
021	1763	+	4233	-
022	1984	+	4234	-
023	2228	-	4236	-
024	1836	+	4237	-
025	1413	+	4238	-
026	0580	+	4239	-
027	1430	+	4240	-
028	1410	+	4242	-
029	1071	+	4243	+
030	1849	+	4244	-
031	0585	+	4245	-
032	1762	+	4246	-
033	1978	+	4247	-
034	1635	+	4249	+
035	1494	+	4250	-
036	1359	+	4251	-
037	1748	+	4252	-
038	1756	+	4253	-

	Grupo 1 (Pre-Terapia)		Grupo 2 (Post-Terapia)	
	ID	Resultado	ID	Resultado
039	1241	+	4254	-
040	1079	-	4255	-
041	1491	+	4256	-
042	2258	-	4257	-
043	1502	+	4258	-
044	1227	+	4261	-
045	1099	+	4265	-
046	1096	+	4266	-
047	1106	+	4267	-
048	0502	+	4268	-
049	0690	+	4269	-
050	0952	+	4270	-
051	1104	-	4271	-
052	1832	+	4273	-
053	1834	+	4274	-
054	1097	+	4275	-
055	0511	+	4276	+
056	1966	+	4277	-
057	2216	-	4278	+
058	1098	+	4279	-
059	1475	+	4280	-
060	1476	+	4282	-
061	1478	+	4283	-
062	2417	+	4284	-
063	1468	+	4285	-
064	1449	+	4286	-
065	2442	+	4287	-
066	1472	+	4288	-
067	1461	+	4289	-
068	1939	+	4290	+
069	2093	+	4291	-
070	1819	+	4293	-
071	1947	-	4294	-
072	1469	-	4295	-
073	1460	+	4297	-
074	2122	+	4299	-
075	1178	+	4302	-
076	1089	+	4303	-

	Grupo 1 (Pre-Terapia)		Grupo 2 (Post-Terapia)	
	ID	Resultado	ID	Resultado
077	1172	-	4304	-
078	1055	+	4306	+
079	1052	+	4307	-
080	2128	-	4308	-
081	1910	+	4309	-
082	1905	+	4310	-
083	1666	+	4312	-
084	2570	+	4313	-
085	1416	+	4314	-
086	1655	+	4315	-
087	1667	+	4316	-
088	0524	-	4317	-
089	2303	+	4318	-
090	2307	+	4319	-
091	1283	+	4320	-
092	1282	+	4321	-
093	1542	-	4322	-
094	1733	+	4323	-
095	1088	+	4324	-
096	1883	+	4326	-
097	1668	+	4328	-
098	1081	+	4329	-
099	0966	+	4331	-
100	0893	+	4332	-
101	0083	+	4333	-
102	2014	+	4334	-
103	2043	-	4335	-
104	0052	+	4336	-
105	1425	+	4337	-
106	1087	-	4338	-
107	1421	-	4340	-
108	1418	+	4341	-
109	0088	+	4342	-
110	0892	+	4343	-
111	1867	-	4344	-
112	1728	+	4346	-
113	2558	+	4347	-
114	1083	+	4348	-

ID: Número de identificación de muestra.