



UNIVERSIDAD DE GRANADA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA
GRUPO de BIOQUIMICA Y PARASITOLOGIA MOLECULAR

ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA.
REACCION DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)
APLICADA AL DIAGNOSTICO
Y EVALUACION QUIMIOTERAPEUTICA

TESIS DOCTORAL

INES ADRIANA ZULANTAY ALFARO

Granada, 2005



UNIVERSIDAD DE GRANADA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
GRUPO DE BIOQUIMICA Y PARASITOLOGIA MOLECULAR

ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA.
REACCION DE POLIMERASA EN CADENA (PCR)
APLICADA AL DIAGNOSTICO
Y EVALUACION QUIMIOTERAPEUTICA

LOS DIRECTORES

Prof. Dr. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz
Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada

Prof. Dr. Werner Apt Baruch
Instituto de Ciencias Biomédicas.
Facultad de Medicina. Universidad de Chile

TUTOR

Prof. Dra. Carmen Mascaró Lazcano

Tesis presentada para optar al Grado de Doctor,
por la Licenciada **INES ADRIANA ZULANTAY ALFARO**

.....

Granada, Octubre de 2005

Los trabajos de investigación expuestos en la presente Memoria titulada “ENFERMEDAD DE CHAGAS CRONICA. REACCION DE POLIMERASA EN CADENA (PCR) APLICADA AL DIAGNOSTICO Y EVALUACION QUIMIOTERAPEUTICA”, han sido realizados en los laboratorios del Grupo de Bioquímica y Parasitología Molecular de la Universidad de Granada, bajo la supervisión del Dr. D. Antonio Osuna Carrillo de Albornoz y en laboratorios del Programa de Biología Celular y Molecular del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, bajo la supervisión del Dr. D. Werner Apt Baruch.

Granada, Octubre de 2005

EL DIRECTOR DEL INSTITUTO

Fdo.: Dr. D. A. OSUNA CARRILLO DE ALBORNOZ

FINANCIAMIENTO

Esta Tesis ha sido financiada por los Proyectos DI-SAL 03/6-2, Universidad de Chile y FONDECYT 104073. Contó además con el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile, el Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, España y la Oficina de Relaciones Internacionales, Universidad de Granada, España.

LISTA DE ABREVIATURAS

A/A	trazado electrocardiográfico alterado
A/N	trazado electrocardiográfico alterado que se normaliza
BSA	albúmina sérica bovina
csp	cantidad suficiente para
dCTP	deoxi citosin trifosfato
dNTP	dinucleótidos tri-fosfato
ECG	electrocardiograma
ELISA	ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
HAI	Hemaglutinación indirecta
hrs	horas
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
kDa	kilodaltons
kDNA	DNA del kinetoplasto
kpb	kilo pares de bases
N/A	trazado electrocardiográfico que progresa de normal a alterado
N/N	trazado electrocardiográfico normal - normal
Primer 121	5'- AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA
Primer 122	5'- GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA
Primer S35	5'-AKTTGAACGCCCTCCCA
Primer S36	5'- ATTG-GGGTTGGTGTAATATAG
Primer Tcz1	5'- CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT
Primer Tcz2	5'- CCTCCAAGCAAGCGGATAGTTCAGG
RFLP	polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción

rpm	revoluciones por minuto
S	sur
Taq	enzima termoestable aislada de <i>Termus aquaticus</i>
TRIS	TRIS (hidroximetil) aminometano
U	unidades enzimáticas
XD	xenodiagnóstico
Z	zimodema

INDICE

	Página
INDICE DE MATERIAS	i
INDICE DE FIGURAS	ii
INDICE DE TABLAS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
I INTRODUCCION	1
A. Introducción general	1
B. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
a. Generalidades	2
b. Kinetoplasto	5
c. Genética	5
d. Poblaciones de <i>T.cruzi</i> circulantes en Chile	8
e. Amplificación de kDNA de <i>T. cruzi</i> por PCR	9
f. Xenodiagnóstico	9
II ANTECEDENTES	10
C. Enfermedad de Chagas	10
a. Generalidades	10
b. Epidemiología	11
c. Diagnóstico serológico y parasitológico	13
d. Xenodiagnóstico	14
e. Reacción de Polimerasa en Cadena aplicada a enfermedad de Chagas	15
f. Tratamiento quimioterapéutico	18
III OBJETIVO GENERAL	20

IV	OBJETIVOS ESPECIFICOS	21
V	MATERIAL Y METODO	21
A.	Ensayo clínico	21
B.	Diagnóstico serológico	21
C.	Tratamiento anti-chagásico	22
D.	Xenodiagnóstico	23
E.	Deyecciones de triatominos	24
F.	Electrocardiograma	24
G.	Población en estudio	25
a.	Objetivo Específico 1	25
b.	Objetivo Específico 2	25
c.	Objetivo Específico 3	26
d.	Objetivo Específico 4	27
H.	Muestra de sangre periférica para PCR	27
I.	Extracción de DNA kinetoplastídico	28
a.	Protocolo 1	28
b.	Protocolo 2	29
J.	Purificación de DNA kinetoplastídico	28
a.	Protocolo 1	28
b.	Protocolo 2	29
K.	Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR)	30
a.	Partidores	30
b.	Solución de reacción para PCR	31
c.	Programas de amplificación	31
d.	Electroforesis	32
L.	Southern blot	33
M.	Marcación reactiva de la sonda	33
N.	Hibridación con la sonda radioactiva	34
O.	Análisis estadístico	35

VI	RESULTADOS	36
A.	Ensayos de PCR e hibridación de productos amplificados	36
B.	Correlación entre la condición parasitológica de chagásicos crónicos tratados en seguimiento prolongado, establecida mediante XD, PCR e hibridación y la evolución (regresión o prevención) de las anormalidades electrocardiográficas	38
C.	Sensibilidad y precocidad de la detección de la banda de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR en deyecciones de <i>Triatoma infestans</i> utilizados en el XD y alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos	42
D.	Asociación entre la condición parasitológica determinada mediante PCR y XD, con antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intradomiciliario de <i>Triatoma infestans</i> en chagásicos crónicos tratados	46

VII. DISCUSION	48
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. BIBLIOGRAFIA	60
X. PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS	72

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Tripomastigote de <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
Figura 2 Mapa político-administrativo de Chile	12
Figura 3 Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio e hibridación de los productos amplificados donde se observa la banda de 330 pb de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> , detectado en sangre periférica de chagásicos crónicos.	38
Figura 4 Amplificación de la banda de 330 pb de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> en deyecciones de triatomíneos alimentados con sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos mediante XD. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.	45
Figura 5 Amplificación de la banda de 330 pb de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> en deyecciones de triatomíneos alimentados con sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos mediante XD. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Posterior hibridación de los productos amplificados con sonda de kADN de <i>Trypanosoma cruzi</i> marcada con P ³² .	45

INDICE DE TABLAS

	Página
<p>Tabla 1 Detección de la banda de 330 pb de kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i> mediante PCR e hibridación con sondas de kDNA total del parásito marcadas con P³² en sangre periférica de 52 chagásicos crónicos tratados y clasificados de acuerdo a resultados de XD y fármaco recibido</p>	37
<p>Tabla 2 Evolución del trazado electrocardiográfico en chagásicos crónicos con XD, PCR e hibridación positivo (Grupo I) o negativo (Grupo II). Siete años post-terapia</p>	40
<p>Tabla 3 Comparación de la mejoría del ECG inicial con la alteración del ECG al finalizar el estudio en 30 chagásicos crónicos. Siete años post-terapia</p>	40
<p>Tabla 4 Sexo, edad y alteraciones electrocardiográficas específicas pre y post-terapia observadas en 14 chagásicos crónicos tratados con Itraconazol o Alopurinol evaluados en seguimiento prolongado. Siete años post-terapia</p>	41
<p>Tabla 5 Positividad de PCR según períodos de incubación, en muestras de deyecciones de triatomíneos alimentados sobre 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I) y 25 chagásicos crónicos con XD negativo (Grupo II)</p>	43
<p>Tabla 6 Concordancia, complementariedad y precocidad de resultados de PCR en muestras de deyecciones de triatomíneos alimentados sobre 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I) y 25 chagásicos crónicos con XD negativo (Grupo II)</p>	44
<p>Tabla 7</p>	

Secuencia de resultados de XD y PCR en deyecciones de triatomíneos alimentados en 25 individuos chagásicos crónicos XD positivo (Grupo I) según período de incubación	44
---	----

Tabla 8

Antecedentes epidemiológicos de 37 chagásicos crónicos procedentes de zonas rurales de la IV Región, Chile, tratados con Alopurinol o Itraconazol en condiciones de pre-terapia (año 1992) y diez años después de concluida la terapia (año 2002)	47
---	----

Tabla 9

Resultados de XD y PCR obtenidos en 37 chagásicos crónicos procedentes de zonas rurales de la IV Región, Chile, tratados con Itraconazol o Alopurinol en seguimiento prolongado. Diez años post-terapia	47
---	----

RESUMEN

La enfermedad de Chagas crónica se caracteriza por presentar parasitemias subpatentes y escaso parasitismo intracelular. En Chile, hasta hace algunos años, el diagnóstico parasitológico y la evaluación de tratamiento en esta fase de la enfermedad se realizaba exclusivamente mediante Xenodiagnóstico (XD). La Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) y la posterior hibridación de los productos amplificados con sondas de kDNA de *Trypanosoma cruzi*, abrieron nuevas perspectivas para el diagnóstico, evaluación quimioterapéutica y el estudio de diversos aspectos básico-clínicos de la afección.

Los objetivos planteados en este estudio fueron: establecer, en seguimiento prolongado, la sensibilidad de PCR en chagásicos crónicos tratados y posterior hibridación de los productos de PCR con sonda de kDNA de *T. cruzi* marcada con P³², en comparación con los resultados del XD; correlacionar, siete años post-terapia, la presencia o ausencia de *T. cruzi* determinada por PCR, XD e hibridación, con la condición electrocardiográfica; evaluar, en comparación con la observación microscópica, la sensibilidad y precocidad de PCR aplicada en deyecciones de triatomos alimentados sobre chagásicos crónicos mediante XD y la complementariedad de ambas técnicas. Finalmente, determinar, diez años post-terapia, si existe asociación entre la positividad de XD y PCR y algunos antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intradomiciliario de *Triatoma infestans*. Todos los individuos procedían de zonas de endemia chagásica bajo control anti-triatomínico y participaron en este estudio bajo consideraciones éticas y consentimiento informado.

Se evidenció mediante PCR y posterior hibridación, una banda de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* en el 60% y 53% de los chagásicos tratados con Itraconazol y Alopurinol, respectivamente y cuyo XD era negativo ($p < 0.0001$). Siete años post-terapia, se demostró la independencia entre la presencia o ausencia de *T. cruzi* determinada por XD, PCR e hibridación y la condición electrocardiográfica. Con respecto a la cardiopatía, se observó un 90% y 88% de prevención, 58% y 50% de regresión y 10% y 13% de progresión, en los grupos con y sin parasitemia, respectivamente ($p > 0.05$). Por otra parte, en casos XD positivo, el PCR demostró mayor precocidad que la observación microscópica, al detectar la banda de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* en el 92% y 100% de los casos, a los 30 y 60 días de incubación de los triatomos, respectivamente. El XD, para los mismos períodos, presentó positividades del 44% y 84% ($p = 0.001$). PCR presentó además mayor sensibilidad, al detectar al parásito en el 36% de los casos con XD negativo. Ambas técnicas demostraron su complementariedad, puesto que a los 30 días, el 48% tuvo PCR positivo mientras el XD fue negativo. Finalmente, se demostró mediante XD y PCR, que la persistencia del parásito en pacientes tratados, no está relacionada con la presencia de *T. infestans* intradomiciliario.

Los resultados de este estudio, han confirmado las ventajas de la aplicación de nuevas técnicas de biología molecular, como el PCR e hibridación, en el estudio de entidades complejas, como lo es la relación hospedador-*T. cruzi* en la enfermedad de Chagas crónica. Al mismo tiempo, nos han permitido plantear nuevas hipótesis de trabajo, que esperamos nos permitan seguir contribuyendo al conocimiento de esta afección.

I. INTRODUCCION

A. Introducción general

Trypanosoma cruzi es un protozoo parásito hemoflagelado que pertenece al Orden Kinetoplastida, Familia Trypanosomatidae. Produce la denominada enfermedad de Chagas o trypanosomiasis americana, endémica desde el sur de los Estados Unidos (42° N) al sur de Argentina y Chile (43° S). Esta afección compromete a unos 30 millones de personas existiendo unos 90 millones con riesgo de contraerla por vivir en áreas endémicas (Brener y cols, 2000; WHO, 1991).

La mayoría de las personas adquieren la enfermedad de Chagas en forma silenciosa, sin presentar síntomas y signos de la enfermedad. En Chile, la mayoría de los individuos con enfermedad de Chagas crónica, se encuentran en el período indeterminado, el cual se caracteriza por presentar bajos y esporádicos niveles de parasitemia (Brener y cols, 2000; Umezawa y cols, 2001).

La enfermedad de Chagas debe ser tratada en todos los periodos del curso de la misma salvo en el periodo crónico termina. No existe un fármaco ideal para para la etapa crónica. Los únicos fármacos que se utilizan en el hombre de acuerdo a normas éticas y clínicas son Nifurtimox y Benznidazol (OPS/OMS 1999; Rodríguez Coura y De Castro, 2002).

Los efectos adversos de estos fármacos y su limitada eficacia en casos crónicos, ha sugerido investigar otros fármacos ya utilizados en el tratamiento de otras patologías no relacionadas, y que exhiben actividad contra *T. cruzi* y son inocuos para el hombre, tales como Alopurinol e Itraconazol (Apt, 1999).

La evaluación del tratamiento de la enfermedad de Chagas en la fase crónica humana, está limitada por la ausencia de un criterio fidedigno de curación. En los últimos años, la técnica de PCR (Reacción de Polimerasa en Cadena) y posterior hibridación de los productos amplificados, han sido aplicadas en diversos estudios de evaluación post-terapia, evidenciando su alta sensibilidad (Solari y cols, 1998; Britto y cols, 1995b; Britto y cols, 2001; Zulantay y cols, 2004). No obstante, otras herramientas parasitológicas, tales como el Xenodiagnóstico (XD), aún constituyen alternativas para evaluar a chagásicos crónicos sometidos a terapia específica (Schenone y cols, 2003).

Por otra parte, no existe consenso acerca de la utilidad de la evaluación electrocardiográfica en el seguimiento de chagásicos crónicos tratados, no obstante Apt y cols (2003), evidencian regresión y prevención de anomalías en pacientes tratados con Alopurinol o Itraconazol.

B. *Trypanosoma cruzi*

a.- Generalidades

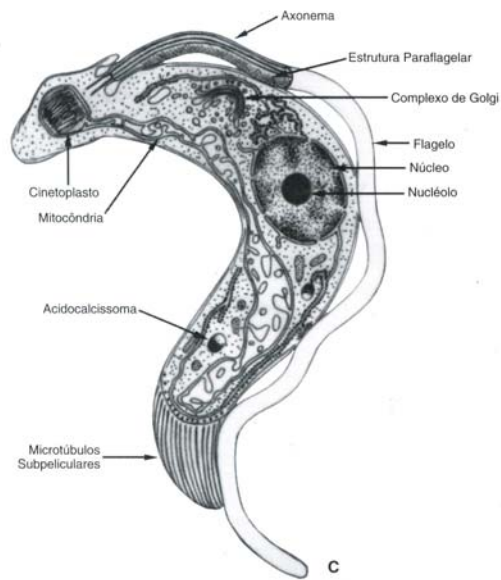
Trypanosoma cruzi es un protozoo mastigóforo perteneciente a la Familia Trypanosomatidae, en cuyo ciclo biológico intervienen mamíferos e insectos vectores reduvídeos de la Familia Triatomidae (Atías, 2000). Los parásitos son transmitidos a través de las deposiciones infectadas que el vector elimina en el momento de alimentarse (Brener, 1985). Los hospedadores mamíferos pueden ser el hombre y algunos animales domésticos (caninos, felinos, caprinos, bovinos, equinos, ovinos y conejos) o silvestres (roedores, primates, marsupiales y edentados) (Wendel y cols, 1992).

Los vectores biológicos de *T. cruzi* son insectos hematófagos limitados a invertebrados del Orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae que incluye a más de 100 especies. De los 16 géneros distintos que son susceptibles a la infección por *T. cruzi*, los más importantes son *Pastrongylus*, *Rhodnius* y *Triatoma* (Goble, 1970; Pinto Días, 1990). Los triatominos vectores de *T. cruzi* están distribuidos entre las latitudes 42° N (sur de California) y la latitud 43° S (Argentina y Chile) (PHAO, 1994).

En Chile, *Triatoma infestans* representa la especie de mayor importancia epidemiológica para la enfermedad de Chagas por su adaptación al ámbito humano, alimentándose del hombre y sus animales domésticos, manteniendo el ciclo doméstico de la enfermedad. El otro vector, *Mepraia spinolai* (sinonimia: *Triatoma spinolai*), sólo se ha descrito en Chile y habita en zonas silvestres especialmente canteras, guaneras de aves, cuevas de animales, ocasionalmente en corrales y muros de piedra periantrópicas y rara vez en la vivienda humana. Su valor epidemiológico radica en el mantenimiento del ciclo silvestre de la enfermedad (Canals y cols, 2000). En sus diversos hospedadores y en los medios de cultivo *T. cruzi* presenta tres aspectos morfológicos fundamentales: tripomastigote, de aspecto fusiforme, de unos 20 µm de largo, con citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Posee un kinetoplasto subterminal posterior al núcleo, del cual emerge una membrana ondulante que recorre al parásito y en cuyo borde libre lleva un flagelo que emerge por la extremidad anterior (Figura 1); epimastigote, de aspecto fusiforme, de unos 20 µm de largo, con un kinetoplasto localizado por delante del núcleo, o a su nivel, y presenta una corta membrana ondulante y un flagelo libre; amastigote, elemento redondeado de unos 2 µm de diámetro, en el cual se distingue el núcleo y el

kinetoplasto, aparentemente aflagelado, con un corto flagelo no emergente visible al microscopio electrónico (Brener y cols, 2000).

Figura 1



Tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*

Los triatomíneos se infectan al ingerir sangre de mamíferos que contienen tripomastigotes, los que se multiplican activamente como epimastigotes por fisión binaria en el intestino medio del insecto, al cabo de 15-30 días, se eliminan en forma de tripomastigotes metacíclicos a través de las deyecciones emitidas por el insecto infectado en el momento de picar a un nuevo mamífero. Las formas tripomastigotes infectantes atraviesan la piel por el sitio de la picadura hasta penetrar en las células del huésped vertebrado donde se diferencian a amastigotes, que se multiplican hasta romper la célula huésped infectando nuevas células o invadiendo la sangre periférica. El ciclo biológico se

completa cuando los tripomastigotes son ingeridos por los insectos hematófagos (Atías, 2000).

T. cruzi se compone de una amplia variedad de poblaciones circulantes en insectos vectores, animales vertebrados que actúan como reservorios del parásito y en el hombre. Esta amplia diversidad podría implicar características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas, las cuales incluirían efectos patológicos, inmunológicos, vulnerabilidad a fármacos y otras características de importancia médica (Dvorak, 1984; Ayala, 1993). Esto ha motivado la generación de diversas líneas de investigación sobre sus propiedades biológicas, que incluye curvas de parasitemia, respuesta inmune, sensibilidad a fármacos y virulencia en modelos experimentales, etc. (Brener y cols, 2000).

b.- Kinetoplasto

T. cruzi, como también otros miembros de la Familia Trypanosomatidae, se caracteriza por poseer una única mitocondria (Simpson, 1972; Brener y cols, 2000). El DNA kinetoplastídico (kDNA) representa cerca del 20% del DNA total del parásito. Está formado por minicírculos (1.4 kpb) y maxicírculos (1.6 kpb) de DNA encadenados formando una compleja red compacta (Riou y Pautrizel, 1969). Existen al menos 50 copias idénticas de maxicírculos que son similares al DNA mitocondrial de los eucariontes superiores y codifican RNAs ribosomales y proteínas involucradas en la generación de ATP en la mitocondria (Simpson, 1987). Los minicírculos existen en número variable (entre 3000 y 30000 copias), pudiendo haber heterogeneidad de secuencia entre los minicírculos de cada clon de *T. cruzi*. Cada minicírculo representa cuatro regiones de secuencia altamente conservada, las cuales están regularmente distribuidas cada 90° entre si y con un tamaño cercano a las 120 pb y representan los orígenes de replicación de los minicírculos

(Kitchin y cols, 1985). Así también, contiene cuatro regiones hipervariables en secuencias de tamaño cercano a 250 pb (Ray, 1989; Sheline y cols, 1989); Coelho y Cols, 2003)

c.- Genética

El genoma de *T. cruzi* está en dos compartimentos celulares bien definidos, núcleo y mitocondrias que contienen el kinetoplasto (Brener y cols, 2000). Estudios de aloenzimas o fragmentos de restricción de kDNA han mostrado un marcado polimorfismo en poblaciones naturales de *T. cruzi*. Por otra parte, el análisis de isoenzimas mediante electroforesis (zimogramas) ha permitido la clasificación de parásitos aislados de diferentes hospedadores en categorías llamadas zimodemas (Tibayrenc y Ayala, 1988). Un zimodema incluye todos los parásitos que muestran patrones idénticos para un grupo de enzimas. La caracterización de diferentes poblaciones de parásitos ha sido también realizada por estudios de polimorfismo de los fragmentos de restricción del kDNA (RFLP). Los parásitos que exhiben el mismo patrón de RFLP pertenecen a un mismo esquizodema. Diferentes grupos de investigadores han descrito una estrecha correlación entre zimodemas y esquizodemas, sugiriendo que los genes estructurales nucleares que codifican enzimas y el DNA extranuclear (kDNA) han tenido una evolución paralela (Montamat y cols, 1999).

Miles y cols (1977, 1978), estudiando cepas de *T. cruzi* en el norte de Brasil, describen la presencia de tres zimodemas (Z1, Z2 y Z3). Los parásitos Z1 y Z3 fueron encontrados en el ciclo selvático y en casos agudos humanos, mientras los parásitos Z2 fueron encontrados en el ciclo de transmisión doméstico. Luego de extensos estudios de genética de poblaciones de *T. cruzi* en diversos países de Sudamérica, surgió la teoría de estructura clonal para las poblaciones de este parásito. Para incrementar la cantidad de sistemas isoenzimáticos, Tibayrenc y cols, (1986) y Tibayrenc y Ayala (1988), analizaron

los perfiles isoenzimáticos de 645 muestras de *T. cruzi* aislados de una variedad de hospedadores vertebrados e invertebrados con una amplia distribución geográfica, observándose en ellos una amplia variedad genética. Estudios de epidemiología genética han permitido identificar al menos 43 zimodemas distintos (Z1 a Z43), correspondiente a clones naturales de *T. cruzi* (Tibayrenc, 1998).

Otras investigaciones han empleado técnicas de hibridación de DNA y análisis de esquizodemas (generación de fragmentos de kDNA por el uso de enzimas de restricción) en poblaciones de *T. cruzi* en Chile y otros países de América del Sur. Estos estudios concuerdan con la caracterización mediante isoenzimas y apoyan la hipótesis de clonalidad, lo que implica que los marcadores específicos del kDNA y del DNA nuclear son transmitidos en conjunto a la progenie (Carreño y cols, 1987, Solari y cols, 1992, Venegas y cols, 1997). Tibayrenc y Ayala (1988) determinan la existencia de clones muy cercanos genéticamente, como también la amplia distancia genética que los separa de otros. El número de clones en el taxón *T. cruzi* no es limitado, como se ha demostrado al incrementar el número de cepas estudiadas utilizando técnicas de mayor resolución que han permitido evidenciar una mayor variabilidad (Breniere y cols, 1999).

Tibayrenc y Ayala han analizado la evolución de *T. cruzi* mediante el análisis de zimodemas. Asumiendo que el parásito es diploide, ellos han asignado un correspondiente genotipo a cada uno de los fenotipos observados y aplican un criterio de genética de poblaciones para evaluar los resultados. Observaron la ausencia de segregación alélica y de recombinación génica, indicando que la reproducción sexual es muy restringida y concluyen que las poblaciones circulantes de *T. cruzi* tienen básicamente un estructura clonal. (Montamat y cols, 1999).

T. cruzi exhibe en la naturaleza una alta variabilidad genética, demostrada por diferentes marcadores (Miles, 1983, Tibayrenc y Ayala 1988, Gibson y Miles 1986, Solari y cols, 1991; Solari y cols, 1992, Steindel y cols, 1993, Tibayrenc y Ayala 1993). Esta amplia diversidad podría implicar características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas (Miles y cols, 1977; Dvorak, 1984; Ayala, 1993; Fonseca y Romanha 1999).

d.- Poblaciones de *T. cruzi* circulantes en Chile

En Chile circulan fundamentalmente cinco tipos de clones; ellos son los clones 19, 20, 32, 33 y 39, llamados clones mayores por ser muy frecuentes en extensas regiones de Latinoamérica (Tibayrenc y Breniere, 1988). En Chile, los clones 19 y 20 se encuentran preferentemente en el ciclo silvestre, es decir, en el hábitat de *M. spinolai* y de animales silvestres (Frías y cols, 1998). Por el contrario, aislados de *T. cruzi* pertenecientes a este mismo grupo fueron hallados en *T. infestans*, vector exclusivo de la enfermedad en la II Región del país (González y cols, 1995).

Por su parte, los clones 32, 33 y 39 circulan de preferencia en el ciclo doméstico, son transmitidos por *T. infestans* y se encuentran en el hombre, aunque el clon 39 es el más frecuente (Solari y cols, 1992) y parece representar casi el único existente en sectores rurales de la Región Metropolitana (Muñoz y cols, 1994).

e.- Amplificación de DNA de *Trypanosoma cruzi* por PCR

El DNA nuclear y kinetoplastídico de *T. cruzi* contiene varias secuencias repetitivas que son de mucha utilidad como blanco para la técnica de PCR. Mediante esta técnica es posible amplificar secuencias específicas fáciles de purificar desde el trypanosoma

(Wincker y cols, 1994; Junqueira y cols, 1996). Con los primers 121 y 122, se amplifican fragmentos de DNA de 330 pb desde la región variable de los minicírculos de *T. cruzi* (Sturm y cols, 1989). Por otra parte, el satélite repetido de DNA nuclear de 195 pb de *T. cruzi*, es el blanco de los primers Tcz1/Tcz2 y Diaz1/Diaz2, los cuales no amplifican DNA desde otros Trypanosomas o Leishmanias. Los primers S35/S36 también amplifican kDNA de otros parásitos Kinetoplastidae tales como especies de *Leishmania* y *T. rangeli*.

f.- Xenodiagnóstico

El Xenodiagnóstico (XD) es un procedimiento desarrollado por Brumpt (1914), que utiliza el vector, mantenido en condiciones de laboratorio, para la detección de la infección de *T. cruzi* en el hombre y otros mamíferos. En el XD se usan ninfas de triatomíneos criadas en laboratorio que son alimentadas con gallinas, refractarias a la infección. Para el XD, se emplea una cajita cilíndrica de madera o material similar que lo reemplace, cubierto por una pieza de gasa, y que contiene 7 a 10 ninfas de tercer estadio del *T. infestans*, el contenedor es sujetado por un brazaletes, y aplicado, durante 20 a 30 min, sobre la superficie de la piel de los miembros superiores de los individuos a examinar. Luego de la aplicación, las ninfas son mantenidas bajo condiciones de laboratorio. A los 30, 60 y 90 días, las deyecciones de los insectos son examinadas microscópicamente en busca de formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi* (Schenone, 1999a).

II. ANTECEDENTES

C. Enfermedad de Chagas

a.- Generalidades

El hospedador humano puede infectarse por variados mecanismos, de los cuales el principal y de mayor importancia epidemiológica es la transmisión a través de las deyecciones de triatominos parasitados. Este es el mecanismo natural, causante de la llamada "infección adquirida". La infección transfusional ha sido considerada como la segunda en importancia, seguida por la infección congénita o transplacentaria (Apt y Reyes, 1990; Atías, 1999; Noireau, 1999). En el hombre, la infección afecta, en grado variable, diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y el tubo digestivo (Apt, 1991).

La infección humana por *T. cruzi* presenta un período de incubación que varía entre los 4 a 10 días, es generalmente asintomática. Posteriormente, sobreviene la fase aguda donde la parasitemia es relativamente alta. En esta fase es frecuente la aparición de una pequeña lesión en el sitio de la picadura denominada chagoma de inoculación, que si está a nivel de la conjuntiva, puede producir un edema duro bipalpebral unilateral, con dacrioadenitis e inflamación del ganglio preauricular el conjunto de estas manifestaciones se denomina síndrome de Romana. En esta fase, los pacientes pueden presentar fiebre, anorexia, diarrea y vómitos, hepato-esplenomegalia, edemas generalizados, adenopatías difusas e inclusive alteraciones electrocardiográficas y/o radiográficas que indican una miocarditis aguda. Cuatro a ocho semanas después de la fase aguda, se inicia la fase indeterminada que se caracteriza por la ausencia de signos y síntomas, y de alteraciones de los exámenes de laboratorio manteniendose por años o por tiempo indefinido. En Chile alrededor de un dos por ciento de estos casos anualmente desarrollan una cardiopatía. En Brasil el porcentaje de pacientes en periodo indeterminado que pasan anualmente a cardiopatas o a mega síndromes digestivos es inferior al 2%. Después de varios años (por lo general más de 10) se desarrolla la enfermedad de Chagas crónica.

Recientemente, se ha dividido la etapa crónica de la enfermedad de Chagas en período crónico reciente (individuos chagásicos menores de 12 años) y en período crónico tardío, que se caracteriza por presentar una parasitemias subpatentes y se puede presentar una miocardiopatía dilatada o megasíndromes digestivos, principalmente megaesófago y megacolon o compromisos del sistema nervioso (OPS, 1999). Estimaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que aproximadamente un 27% de los infectados sufrirá daño cardíaco, un 6% evolucionará hacia el desarrollo de megavisceras y un 3% sufrirá daño neurológico, y un 64% de los infectados no desarrollará sintomatología clínica (Apt y Reyes, 1990; Moncayo, 1991; WHO, 1991; Noireau, 1999).

b.- Epidemiología

La enfermedad de Chagas es de amplia distribución geográfica en Centro y Sudamérica, extendiéndose desde el sur de los Estados Unidos de Norteamérica, en el paralelo 35° latitud norte, hasta Chile y Argentina (Apt y Reyes, 1990). En Chile, el área endemoenzoótica se extiende entre el paralelo 18° por el norte (I Región) y el paralelo 34° por el sur, es decir, VI Región (Apt, 1991), siendo las regiones III y IV consideradas hiperendémicas (Schenone y cols, 1991a; Schenone y cols, 1995a) (Figura 2).

Se estima que en Chile la infección humana por *T. cruzi* en la zona endémica tiene una prevalencia serológica del 16.7% en los sectores rurales - periurbanos y de un 1.9% en los sectores urbanos de esta áreas (Schenone y cols, 1995a). La prevalencia en donantes de sangre se ha determinado en un 2,7% (Contreras y cols, 1992).

Esta situación epidemiológica, sentó las bases para la planificación de programas de eliminación del vector y control de donantes de sangre en zonas endémicas. Es así, como a

través de la Iniciativa de los Países del Cono Sur (OPS, 1996), se ha certificado recientemente a Chile como el segundo país que ha interrumpido la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas. De acuerdo a los antecedentes entregados por la OMS, la disminución en más de un 99.8% en la tasa de infestación domiciliar por *Triatoma infestans*, indicarían que la infección adquirida a través del vector ya no sería el principal mecanismo de transmisión. En relación al control de la infección adquirida a través de la vía transfusional, se ha informado una cobertura del 100% de donantes de bancos de sangre en las áreas endémicas (WHO, 2000).

Figura 2

**Mapa político-administrativo de Chile.
I a VI Región : área de endemia chagásica,
incluida * Región Metropolitana.**

c.- Diagnóstico serológico y parasitológico

Los primeros anticuerpos detectados en el curso de la infección por *T. cruzi* pertenecen a la clase IgM, siendo reemplazados gradualmente por IgG a medida que progresa la infección (Noireau, 1999). En Chile, el diagnóstico serológico se realiza

rutinariamente mediante hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA (Zulantay y cols, 1998a). La sensibilidad de estas técnicas depende de la fase de la enfermedad y del tipo de inmunoglobulina estudiada. De este modo, en la fase crónica, IgG alcanza una sensibilidad entre el 95% y 100%, no así en la fase aguda en que IgM presenta una mayor sensibilidad. La OMS recomienda efectuar al menos dos técnicas serológicas convencionales para confirmar la infección (Noireau, 1999).

Es importante señalar que si bien las técnicas de serología convencional presentan una buena sensibilidad, no permiten determinar la etapa de la infección ni la evolución clínica, así como tampoco permiten realizar estudios de evaluación de la eficacia quimioterapéutica debido a que permanecen positivas en el tiempo, aún cuando las pruebas parasitológicas resulten negativas (Krettli y cols, 1984).

El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas se basa en la demostración de la presencia de *T. cruzi* mediante pruebas directas, aplicadas fundamentalmente en la fase aguda de la infección adquirida. Las más utilizadas son: el examen microscópico de sangre al fresco, micro-hematocrito, Strout, gota gruesa y el xenodiagnóstico (WHO, 1991)

En el período crónico de la enfermedad de Chagas la parasitemia disminuye a niveles subpatentes, por lo que la utilidad de las pruebas directas se ve limitada, siendo en esta etapa los métodos de elección aquellos que detecten anticuerpos específicos contra el parásito.

Desde hace algunos años, la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) ha sido introducida como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la enfermedad, permitiendo no solamente reconocer la presencia de *T. cruzi* en la sangre sino también caracterizar las cepas circulantes (Noireau, 1999).

d.- Xenodiagnóstico

El estudio parasitológico de la infección chagásica en Chile, se ha efectuado principalmente a través del XD, debido a la carencia de otros métodos efectivos disponibles para aislar *T. cruzi* desde la sangre de individuos infectados (Schenone y cols, 1991b; Schenone y cols, 1995b; Schenone y cols, 1999b).

El XD ha demostrado una positividad de 80,3% y 86,4% en la infección congénita y aguda respectivamente, mientras que en el período crónico, el XD constituye la herramienta de elección para el diagnóstico parasitológico, con un rendimiento máximo de un 70% al aplicar seis pruebas (2 diarias) con 7 ninfas de *T. infestans* (Schenone y cols, 1991b; Schenone, 1999a).

Por otra parte, el rendimiento aumenta significativamente a medida que aumenta el número de pruebas por xenodiagnósticos utilizados (Schenone y cols, 1991b), es por esto que se aconseja el uso de XD seriado, en especial para el diagnóstico parasitológico de individuos con enfermedad de Chagas crónica (Schenone, 1999b).

Por las características mencionadas anteriormente, el XD es considerado en Chile una buena herramienta para detectar *T. cruzi*, tanto para el diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas, como para la selección de pacientes que recibirán tratamiento específico y posterior evaluación. También se ha utilizado para evaluar parasitemia y su relación con las condiciones clínicas de la enfermedad.

Los resultados de las investigaciones muestran que casi la mitad de las infecciones biclonales no son detectadas después de completar el ciclo, y que existen importantes diferencias en la detección de tales infecciones de acuerdo a los genotipos clonales considerados. Más aún, la eliminación de un genotipo clonal por otro, es frecuente, pero no

constante. El uso de PCR y sondas de kDNA hace posible evitar la fase de cultivo, lo cual hace la detección de infecciones mixtas mucho más fácil en estudios epidemiológicos. Mas aún, el hecho de que *T. infestans* no transmita diferentes genotipos clonales con la misma eficiencia, tiene fuertes implicaciones para la fiabilidad del XD (Da Silveira Pinto y cols, 2002).

Otra de las desventajas de este método, es el período que transcurre para obtener un resultado, el que varía entre 30 y 120 días (WHO, 1991; Noireau, 1999).

e.- Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR)

La técnica de PCR es un método enzimático de síntesis de múltiples copias de un segmento de DNA. Se asemeja al proceso natural de replicación de DNA donde el número de moléculas se duplica después de la repetición de tres pasos bajo condiciones de temperaturas controladas: desnaturalización de la molécula de DNA usada como molde; hibridación de los iniciadores o primers a sitios vecinos a la región a ser amplificada y extensión o elongación del cebador mediante la DNA polimerasa (Oste, 1998).

El desarrollo de esta técnica, ha permitido llevar a cabo el diagnóstico parasitológico de *T. cruzi* amplificando DNA desde regiones altamente repetidas del genoma de *T. cruzi*, constituyéndose en una herramienta para ser utilizada en el diagnóstico de la infección (Wirth y cols, 1989; Moser y cols, 1989; Avila y cols, 1991; Britto y cols, 1993; Junqueira y cols, 1996). Desde hace algunos años, la técnica de PCR ha sido introducida como método de diagnóstico parasitológico en las diferentes etapas de la enfermedad de Chagas, permitiendo no solamente reconocer la presencia de *T. cruzi* en la sangre sino también caracterizar las cepas circulantes. El uso de PCR abrió una nueva

perspectiva en el campo del diagnóstico de la infección chagásica, demostrando ser una herramienta sensible y específica (Noireau, 1999).

Numerosos estudios realizados en la última década han evidenciado que la técnica de PCR en muestras de sangre de individuos infectados posee mayor sensibilidad en relación a otras técnicas de diagnóstico parasitológicas, tales como XD y hemocultivo (Solari y cols, 2001b; Brener y cols, 2002). En Chile, en un estudio realizado en 67 niños menores de 10 años con infección chagásica determinada por serología convencional, el PCR evidenció una sensibilidad del 97% (Solari y cols, 2001a), mientras que en 79 individuos donantes de sangre serológicamente positivos para *T. cruzi* procedentes de la Región Metropolitana, la sensibilidad para PCR fue del 69,3% (Arancibia, 1998; Soto, 1998). Otros estudios realizados en pacientes crónicos en distintas áreas geográficas del Brasil y en los que se emplearon diferentes volúmenes de muestra, revelaron porcentajes de sensibilidad que oscilan entre el 59.4% y el 100% (Junqueira y cols, 1996). Es decir, existirían variaciones de los niveles de parasitemia detectados por PCR que dependerían de la fase de la infección, edad del paciente, volúmenes de muestras empleados y área geográfica de los individuos analizados.

PCR ha sido además aplicado en la detección de kDNA de *T. cruzi* en deyecciones de triatomos. Bosseno y cols (1996), aplicaron PCR en deyecciones de triatomos naturalmente infectados y en sangre de pacientes procedentes de las mismas zonas endémicas entregando importante información epidemiológica. Por otra parte Brenier y cols (1995), mediante PCR y ensayos de hibridación en deyecciones de diversas especies de triatomos silvestres, determinaron la existencia de infecciones mixtas e identificaron los principales clones circulantes. Silber y cols (1977), describen la aplicación de PCR en las deyecciones de triatomos alimentados con sangre de pacientes chagásicos. Se ha descrito

además, la aplicación de PCR en deyecciones y hemolinfa de triatominos recogidos sobre papel filtro, demostrándose alta sensibilidad (Machado y cols, 2000). Por otra parte, Dorn y cols (2001), describen la aplicación del PCR en muestras de tejido fresco de triatominos (recto más intestino) y en deyecciones de los mismos triatominos, obteniendo porcentajes comparables de sensibilidad. Chiurillo y cols (2003), describen la aplicación de PCR en heces de vinchucas experimentalmente y naturalmente infectadas. Finalmente, la utilización de insectos vectores infectados con *T. cruzi* ha constituido una herramienta vital para la evaluación de los programas de control cuyo propósito es reducir la transmisión vectorial de *T. cruzi* en áreas endémicas de Latinoamérica (Osherov y cols, 2003; Guevara y cols, 2005).

f.- Tratamiento quimioterapéutico

La quimioterapia específica para la enfermedad de Chagas es de reciente aplicación (1970). Al respecto, son muchas las investigaciones que se han realizado para encontrar fármacos apropiados que muestren por una parte, alta actividad tripanocida y muy baja o nula toxicidad para el hospedador (Apt y cols, 1999). De acuerdo a la OMS, el fármaco ideal debería conseguir cura parasitológica de casos agudos y crónicos, ser eficaz en una o pocas dosis, ser accesible a los pacientes y carecer de efectos colaterales y teratogenicidad, no requerir hospitalización y no causar resistencia parasitaria (Coura, 1996).

Actualmente, el tratamiento quimioterapéutico de la enfermedad de Chagas se recomienda en individuos que cursan con fase aguda, infección transplacentaria, fase crónica reciente e intermedia y fase indeterminada. Por el contrario, el tratamiento no es recomendado en aquellos pacientes crónicos tardíos con Core bovis e insuficiencia cardíaca terminal (Apt, 1999).

Muchas son los fármacos útiles *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi*, pero las únicas que se pueden aplicar al hombre de acuerdo a las normas éticas y clínicas internacionales son Benznidazol y Nifurtimox (OPS, 1999; Apt, 1999). En la actualidad, ambos fármacos existen en forma restringida (Apt y cols, 1994) y presentan alta toxicidad y serios efectos colaterales especialmente en el adulto con infección crónica.

Investigaciones realizadas por Apt y cols (1998), en un grupo de 404 pacientes con enfermedad de Chagas crónica tratados con Itraconazol o Alopurinol, permitieron evidenciar cura parasitológica en el 44% de los pacientes tratados con Alopurinol y 53% de aquellos tratados con Itraconazol. De acuerdo a lo descrito en la literatura, ambas moléculas, especialmente Itraconazol, son parcialmente eficaces para el tratamiento de la infección chagásica crónica, demostrando además ser bien toleradas, constituyéndose en una buena alternativa terapéutica (Aguilera y cols, 1987; Apt, 1999; Noireau, 1999).

En la fase aguda y crónica reciente, el seguimiento post-terapia se realiza a través de evaluación clínica, parasitológica (hemocultivo y/o XD) y serológica. La negativización permanente de estos parámetros por un período prolongado, permite establecer la curación del individuo (Apt, 1999). En la fase crónica reciente, la negativización de la serología convencional se obtiene años después de finalizado el tratamiento (OPS, 1999).

Por el contrario, en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, no se cuenta hasta hoy con un criterio fidedigno de curación. Es así como los anticuerpos anti- *T. cruzi* detectados por serología convencional, persisten por tiempo indefinido después de la eliminación del parásito circulante (Apt y cols, 1994). Por otra parte, la utilización de XD como herramienta única de evaluación parasitológica, se ve limitada por su bajo rendimiento. Es así que, bajo estas condiciones, un resultado negativo no se puede

interpretar como curación parasitológica (Cerisola y cols, 1977; Schenone y cols, 1981). Apt (1999), sugiere como criterio de curación en la enfermedad de Chagas crónica la negativización post-terapéutica de dos o más parámetros tales como: XD, PCR, hemocultivo, anticuerpos líticos, mejoría de condición clínica y alteraciones electrocardiográficas. Por otra parte, un grupo de expertos recomienda evaluación anual por serología convencional, aún cuando la serología puede disminuir sus títulos y aún tornarse negativa después de 10 o más años de seguimiento (OPS, 1999).

III. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad de la Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) en el diagnóstico, la evaluación quimioterapéutica y epidemiología de la enfermedad de Chagas crónica.

IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el rendimiento de PCR y posterior hibridación de los productos amplificados para detectar *Trypanosoma cruzi* en pacientes chagásicos crónicos tratados con Itraconazol o Alopurinol y evaluados parasitológicamente en seguimiento prolongado.
2. Demostrar, retrospectivamente, si la condición parasitológica de chagásicos crónicos tratados en seguimiento prolongado, establecida mediante XD, PCR y PCR-hibridación,

se asocia con la evolución (regresión o prevención) de las anormalidades electrocardiográficas.

3. Determinar la sensibilidad y precocidad de la detección de kDNA de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de *Triatoma infestans* utilizados en el XD y alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos.
4. Determinar, si existe asociación entre la condición parasitológica determinada mediante PCR y XD, con antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intra-domiciliario de *Triatoma infestans* en chagásicos crónicos tratados.

V. MATERIAL Y METODOS

A. Ensayo clínico

En el año 1992, un total de 404 individuos con enfermedad de Chagas crónica (rango de edad: 9-50 años), procedentes de la IV Región, V Región y Región Metropolitana de Chile, fueron agrupados al azar y asignados para ser tratados con Itraconazol (n=135), Alopurinol (n=104) o Placebo (n=165). Antes del tratamiento, se evaluó la condición clínica, parasitológica, serológica y electrocardiográfica. Los esquemas de tratamiento y el protocolo de seguimiento fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Los pacientes fueron informados en detalle acerca del protocolo y bajo consentimiento informado aceptaron formar parte del estudio (Apt y cols, 1998). Anualmente, se han realizado controles clínicos, serológicos, parasitológicos y epidemiológicos de los pacientes chagásicos crónicos tratados, con un período de seguimiento promedio de 13 años 4 meses.

B. Diagnóstico serológico

La condición de infectados por *Trypanosoma cruzi* fue establecida antes del tratamiento con Itraconazol o Alopurinol mediante los tests de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y ELISA IgG. IFI-IgG fue aplicada de acuerdo a la técnica descrita por Camargo (1979), utilizando como antígeno formas epimastigotas de *T.cruzi* cepa Tulahuén. Se consideró una reacción positiva cuando el título fue igual o mayor a 1/20. En cada determinación fueron incluidos controles positivos y negativos. La técnica inmunoenzimática de ELISA IgG, se aplicó de acuerdo a lo descrito por Voller (1975), utilizando como antígeno formas epimastigotes de *T.cruzi*, cepa Tulahuén. Se utilizaron 5 µg de antígeno por pocillo. La determinación de densidad óptica se realizó en lector automático Dynatech a 490 nm. El límite discriminativo de positividad, el denominado valor de corte, se calculó como el producto de la media aritmética de los controles negativos más tres veces el valor de la desviación standard.

Las formas epimastigotes de *T.cruzi* utilizadas en ambos tests, fueron obtenidas de cultivo axénico en medio Diamond suplementado con 5% de suero fetal bovino y mantenidos a 28°C. Los epimastigotes fueron recolectados en la fase exponencial de crecimiento y centrifugados a 3000 rpm por 10 min a 4°C.

Todos los controles realizados en los individuos chagásicos crónicos tratados y no tratados evaluados en el presente estudio, incluyeron estudios inmunológicos mediante IFI-IgG y ELISA-IgG.

C. Tratamiento antichagásico

Itraconazol (Janssen Farmacéutica Beerse, Bélgica) se administró por vía oral en dosis de 6 mg/Kg/peso/día durante 120 días en dos tomas diarias y el Alopurinol (Laboratorio Silesia y Laboratorio Saval. Santiago, Chile), se administró por vía oral en dosis de 8,5 mg/Kg/día/peso durante 60 días en una toma diaria. Los fármacos fueron administrados por terapia directamente observada, es decir, un auxiliar de enfermería controló que los pacientes ingirieran las tabletas. Para controlar los posibles efectos adversos del tratamiento, se evaluó en el laboratorio antes del tratamiento, una vez al mes y 30 días después de completar la terapia, la bilirrubinemia, colesterol total, alanina amino transferasa, aspartato amino transferasa y fosfatasas alcalinas. La tolerancia fue considerada buena cuando no hubieron signos o síntomas secundarios atribuibles a los fármacos y los resultados de las pruebas de laboratorio estuvieron normales. La tolerancia fue considerada moderada cuando existían leves signos o síntomas y/o mínimas alteraciones de las pruebas de laboratorio. La tolerancia fue considerada insatisfactoria cuando existían severos signos y síntomas y/o importantes alteraciones de las pruebas de laboratorio, lo cual condujo a la interrupción de la terapia (Apt y cols, 1998). Concluida la administración de ambos fármacos, la tolerancia fue considerada satisfactoria (Apt y cols, 2003).

D. Xenodiagnóstico

Se aplicó según técnica descrita por Schenone y cols (1974). Cada caja para el XD contiene 7 ninfas de tercer o cuarto estadio de *Triatoma infestans*, provenientes de una colonia mantenida desde el año 1956 y cuyas condiciones de cultivo son 27°C y 85% de humedad. Los insectos libres de infección utilizados en el XD, en sus diferentes estadios, son alimentados con sangre periférica de aves. Tras su aplicación durante 20-30 min en la cara externa de cada brazo de los pacientes en estudio, las cajas son mantenidas a 27°C para

realizar el examen microscópico de la muestra fecal de cada insecto a los 30, 60, 90 y 120 días de incubación a fin de buscar las formas tripomastigotes de *T. cruzi*. Se usaron 2 cajas de XD para los enfermos en condiciones de pre-terapia y 4 en condiciones de post-terapia. La aplicación del XD en todos los pacientes durante el período de seguimiento, fue paralelo a la toma de muestra de sangre periférica para realizar los PCR.

E. Deyecciones de triatominos

Fueron obtenidas a partir de un pool de deyecciones de triatominos alimentados con sangre periférica de los pacientes en estudio mediante la aplicación de XD a los 30, 60 y 90 días de incubación. Las muestras fueron obtenidas en tubos eppendorf que contenían Medio Diamond, y posteriormente incubadas a 98°C por 15 min para favorecer la ruptura y contaminación del medio con el DNA del parásito y centrifugados a 3500 rpm durante 30 min. El sobrenadante fue purificado mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp. USA) y una vez eluido congelado a -20°C hasta su uso.

F. Electrocardiograma

A todos los chagásicos en estudio, se les realizó evaluación electrocardiográfica antes del tratamiento, cada cuatro meses durante el primer año post-terapia y un control anual durante el período de seguimiento (Apt y cols, 2003). Cada electrocardiograma (ECG) fue codificado (según plantilla AP-P-PR-RR-RS-QT-QTC-AQRS-AT-ATH-rV1-SV1-9RV5-Sokolow) e interpretado a doble ciego por cardiólogos especialistas, según los criterios establecidos para la cardiopatía chagásica crónica (Arribada y cols, 1986). Previamente se

ha descrito la evolución natural de la cardiopatía chagásica crónica (control histórico) en 67 individuos no tratados, cuya procedencia y edad es semejante a los individuos de este estudio. En el ensayo clínico con Itraconazol o Alopurinol, se excluyeron las cardiopatías no atribuibles a enfermedad de Chagas como cardiopatía hipertensiva, aterosclerótica, valvulopatías, cardiopatías congénitas y miocardiopatías observadas mediante echo-doppler (Apt y cols, 1998: Apt y cols, 2003).

G. Población en Estudio

A partir de la población de pacientes participantes en el ensayo clínico y controlados en seguimiento prolongado (Apt y cols, 1998), se agruparon en diferentes períodos post-terapia pacientes tratados y no tratados de acuerdo al objetivo general y objetivos específicos planteados en la presente investigación. Los chagásicos crónicos no tratados incluidos en el presente estudio, proceden de las mismas zonas geográficas de los pacientes tratados y recibieron posteriormente, Itraconazol de acuerdo al protocolo descrito (Apt y cols, 2003).

a. **Objetivo Específico 1:** Para determinar la utilidad de PCR y posterior hibridación de los productos amplificados para detectar *T. cruzi* en los chagásicos crónicos tratados con Itraconazol o Alopurinol y evaluados parasitológicamente en seguimiento prolongado, 52 chagásicos crónicos, 24 hombres y 28 mujeres (promedio de edad 41 años), fueron clasificados de acuerdo al fármaco recibido y a los resultados de XD aplicado después de seis años post-terapia, en los siguientes grupos:

Grupo I 15 chagásicos crónicos tratados con Itraconazol XD negativo

Grupo II 11 chagásicos crónicos tratados con Itraconazol XD positivo

Grupo III 15 chagásicos crónicos tratados con Alopurinol XD negativo

Grupo IV 11 chagásicos crónicos tratados con Alopurinol XD positivo

- b. **Objetivo Específico 2:** Para demostrar, retrospectivamente, si la condición parasitológica de chagásicos crónicos tratados en seguimiento prolongado, establecida mediante XD, PCR e hibridación, se asocia con la evolución (regresión o prevención) de las anomalías electrocardiográficas se evaluó a 30 chagásicos crónicos, con reacciones de ELISA IgG e IFI IgG positivas para enfermedad de Chagas, 16 hombres y 14 mujeres, con edad promedio 33,2 años (rango 10 a 50), procedentes de áreas de la IV Región bajo control anti-*Triatoma infestans*. Se agruparon de acuerdo a la positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) de tres pruebas parasitológicas (XD, PCR e hibridación), aplicadas en un período promedio de 84.1 meses post-terapia.

Grupo I 17 chagásicos tratados con Alopurinol o Itraconazol XD, PCR e hibridación positiva

Grupo II 13 chagásicos tratados con Alopurinol o Itraconazol XD, PCR e hibridación positiva

- c. **Objetivo Específico 3.** Para determinar la sensibilidad y precocidad de la detección de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR en deyecciones de *T. infestans* utilizados en el XD y alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos se constituyeron dos grupos de estudio (22 hombres y 28 mujeres, promedio de edad 47,7 años). Los 50 individuos se clasificaron según su resultado de XD en:

Grupo I 25 chagásicos crónicos no tratados o tratados con Itraconazol o Alopurinol
XD positivo

Grupo II 25 chagásicos crónicos no tratados o tratados con Itraconazol o Alopurinol
XD negativo

d. **Objetivo Específico 4:** Para determinar, si existe una asociación entre la condición parasitológica determinada mediante PCR y XD, con antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intradomiciliario de *T. infestans* en chagásicos crónicos tratados, se estudiaron 37 pacientes chagásicos crónicos, 17 hombres y 22 mujeres (promedio de edad 43 años). Los casos se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: haber sido encuestados antes y diez años después de concluida la terapia con Itraconazol o Alopurinol, que contaran con muestras de sangre periférica para PCR y se les hubiera aplicado XD en condiciones de post-terapia. Finalmente, que su procedencia correspondiera a localidades rurales incorporadas a Programas del Control del Vector.

Grupo I 11 chagásicos tratados con Alopurinol XD positivo

Grupo II 26 chagásicos tratados con Itraconazol XD positivo

H. Muestra de sangre periférica para PCR

Se tomaron 10 ml de sangre venosa de todos los pacientes en estudio que fue mezclada con igual volumen de una solución de Guanidina-HCl 6M y EDTA 0.2M, como preservante y desnaturalizante de enzimas y anticoagulante, respectivamente. La muestra obtenida fue incubada a 98°C por 15 min en Baño María para favorecer el

desencadenamiento de la red de minicírculos y la contaminación de toda la muestra (Britto y cols,1993), tras lo cual fue mantenida a 4°C durante tres días previo a la extracción del kDNA de *T.cruzi*. Se procesaron muestras de sangre bajo las mismas condiciones de individuos serológicamente negativos para enfermedad de Chagas con el fin de ser utilizadas en la reacción como controles negativos.

I. Extracción de DNA kinetoplastídico

a. Protocolo 1. Se alicuotó 500 µl de sangre previamente tratada en tubos eppendorf agregándoseles 1 ml de etanol absoluto para producir una precipitación grosera de las proteínas. Se mezcló en vortex y mantuvieron a –20°C durante 20 min, centrifugándose a 4°C por 15 min a 12.000 rpm y eliminando el sobrenadante obtenido. El proceso se repitió 3 veces. Al botón obtenido se agregó 1 ml de etanol al 70% y se mezcló en vortex para centrifugar a 4°C por 5 min a 12.000 rpm. Se agregó al botón 500 µl de buffer de digestión y 5-7 µl de Proteinasa K (20mg/ml) incubándose toda la noche a 4°C hasta su digestión total. Al resultado de la digestión se agregó 250 µl de fenol y 250 µl de cloroformo-alcohol isoamílico para posteriormente mezclarlos en el vortex y centrifugar a 4°C por 5 min a 12.000 rpm. Este proceso se repitió 2 veces. El sobrenadante obtenido se mezcló con 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico y se centrifugó a 4°C por 5 min. Se midió el sobrenadante obtenido y se agregó acetato de amonio 0.3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto. Se mezcló e incubó a –20°C durante toda la noche. Centrifugándose a 4°C por 15 min a 12.000 rpm eliminando el sobrenadante. Al botón obtenido se agregó 500 µl de etanol al 70% centrifugando nuevamente a 4°C por 10 min. El etanol se eliminó repitiendo el proceso 2 veces.

Finalmente, se evaporó el etanol manteniendo el tubo eppendorf al menos dos días a 4°C reconstituyendo finalmente el DNA extraído en 50 µl de buffer SSC estéril.

- b. Protocolo 2. Se lisaron por incubación de 2 hrs a 37°C o durante toda la noche a temperatura ambiente 250 µl de sangre del paciente previamente incubada a 100°C por 5 min con 250 µl de buffer de lisis (1% SDS, 8mM NaCl, 45 mM EDTA y 75 µg/ml Proteinasa K). Luego de la incubación, se agregó 500 µl de solución fenol y cloroformo-alcohol isoamílico, mezclando en vortex y centrifugando por 10 min a 13.500 rpm. Se recuperó el sobrenadante y el proceso se repitió por 2 veces. Al sobrenadante obtenido se agregó 1000 µl de etanol frío, 50 µl de acetato de amonio 0.25 M y 50 µl de glicógeno (175 µg/ml) para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Luego de la incubación a -20°C durante toda la noche, se centrifugó por 10 min a 13.500 rpm eliminando el sobrenadante y agregando 1000 µl de etanol al 70% para mezclar en vortex y posteriormente centrifugar por 10 min a 13.500 rpm. El botón obtenido se secó a temperatura ambiente y posteriormente fue disuelto en 20 µl de buffer SSC estéril para proceder a la amplificación (Protocolo aplicado en España).

J. Purificación del DNA kinetoplastídico

- a. Protocolo 1. Con el fin de purificar el DNA y eliminar posibles inhibidores de la reacción, se preparó una solución de Sephadex G-25 de una consistencia semi-líquida e irradiada bajo luz ultravioleta. Con esta solución se preparó columnas Bio-Rad y se centrifugó 2 min a 3000 rpm. Posteriormente, se hizo pasar el DNA reconstituido a través de la columna centrifugando durante 2 min a 3000 rpm. El DNA obtenido fue conservado a 4°C hasta su uso.

- b. Protocolo 2. Algunas muestras de DNA fueron purificadas mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp. USA), que consiste fundamentalmente en un proceso cromatográfico al que se somete el DNA extraído a través de sílica gel y posterior elución con buffer Tris-HCl pH 8.5.

K. Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR)

Los ensayos, fueron realizados según protocolo descrito por Solari y cols (2001). Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. La reacción se considera positiva cuando aparece un producto amplificado de 330 pb. Todas las reacciones fueron realizadas en triplicado y en cada una de ellas se incluyó un control negativo (DNA de individuos no chagásicos) y un control positivo de kDNA de *T. cruzi*, así como un tubo sin DNA. Los ensayos se realizaron en duplicado o triplicado y en 40 casos (72%) del grupo de pacientes seleccionados en el Objetivo 1, se realizó un control externo de PCR en el Laboratorio de Parasitología del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con similitudes y semejanzas en el protocolo que se describen a continuación:

a. Primers

Tanto en Chile (GIBCO, BRL Coustom Primers), como en España se utilizaron los partidores 121 y 122 (Britto et al, 1995), sintetizados en el país en que fueron utilizados.

b. Solución de reacción para PCR

La solución de reacción para PCR realizado en Chile estaba constituida por 3 µl de partidores 121 y 122 a una concentración 25 µM; 5 µl de Buffer Taq-polimerasa (67mM de Tris-HCl pH 8.8; 16.6 mM de (NH₄)₂ SO₄; 6.7 mM de MgCl₂; 0.5 µl de BSA; 0.4 mM de los cuatro dNTP); 4 U de Taq Polimerasa (GIBCO BRL) y agua destilada estéril en csp. 50 µl. Luego de incorporar a esta solución 5 µl del DNA extraído y pasado por columna, se agregan 80 µl de aceite mineral, con el fin de evitar evaporación de la mezcla de reacción al ser sometida a las temperaturas de amplificación. En tanto, en el laboratorio de España , la solución de reacción estuvo constituida por 3 µl de partidores 121 y 122 a una concentración 25 µM; 5 µl de Buffer Taq-polimerasa (67mM de Tris-HCl pH 8.8; 16.6 mM de (NH₄)₂ SO₄; 6.7 mM de MgCl₂; 0.5 µl de BSA; 0.4 mM de los cuatro dNTP); 4 U de Taq Polimerasa y agua destilada estéril en csp. 50 µl. Luego de incorporar a esta solución 5 µl del DNA extraído, se agregaron 80 µl de aceite mineral antes de proceder a la amplificación. En ambos laboratorios se incluyeron los controles respectivos.

c. Programas de amplificación

En Chile se utilizó según experiencia previa, el Programa denominado como Brazil 1, que consiste en 2 ciclos iniciales (98°C por 1 min y 64°C por 2 min), 33 ciclos intermedios (94°C por 1 min y 64°C por 1 min) y un 1 ciclo final de 72°C por 10 min. (Winker y cols,1994). Se utilizó un termociclador PTC-100 de MJ Research, Inc. en un tiempo aproximado de 2 hrs 10 min, mientras que en España se utilizó un programa de amplificación que consistió en 3 ciclos iniciales (94°C por 1 min), 35 ciclos intermedios

(94°C por 1 min, 63°C por 1 min y 72°C por 1 min) y 1 ciclo final a 72°C por 10 min. Se utilizó un termociclador BIOMETRA (Goettingen, Germany).

d. Electroforesis

Para visualizar los fragmentos de DNA resultantes de la amplificación, el protocolo desarrollado en Chile consistió en tomar 10 µl de amplificado y mezclar con 4 µl de buffer de carga compuesto de 30% glicerol, 0.25% de azul de bromofenol y 0.25% de xileno-cianol. La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1x, por 2 hrs a 100 v. El gel se tiñó con bromuro de etidio al 1% en buffer TBE 1x y se lavó posteriormente en baño de agitación suave por 10 min. Posteriormente, se tomaron las fotografías de registro con cámara Polaroid. La visualización de una única banda de peso molecular de 330 pb indica la presencia de kDNA de *T. cruzi*, y consecuentemente, resultado positivo de PCR. En cada corrida se incluyó un marcador de peso molecular correspondiente a DNA fago lambda digerido con Hind III o DNA en escalera de 100 pb (0.5 µg/carril).

En España, se preparó geles de agarosa al 2% con el bromuro de etidio incorporado (4.0 µl por gel). Se tomó 4.4 µl de DNA amplificado y 1.5 µl de buffer de carga (SIGMA G 2526) que contenía 0.05% azul de bromofenol, 40% sucrosa, 0.1M de EDTA pH 8.0 y 0.5% SDS). Esta solución de DNA amplificado y buffer de carga, se incubó por 5 min a 100°C antes de cargar los pocillos para la electroforesis, cuya corrida se realizó a 150 v por 1 hora. Se tomaron las fotografías de registro en cámara Polaroid 665 con filtro amarillo o naranja y película 15 Deep Yellow Tiffen.

L. Southern blot

Se llevó a cabo según protocolo descrito por Solari y cols. (2001a). Previo a la transferencia y con el fin de desnaturalizar el DNA, se realizaron tres lavados del gel, de 30 min cada uno, en una solución denaturante de NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M, en baño de agitación. Luego de tres lavados de 5 min con agua destilada, el gel fue neutralizado mediante dos lavados de 30 min cada uno, con buffer de neutralización (Tris-HCl 1 M pH 8.0 y Na Cl 1.5 M). De esta manera, el gel estuvo en condiciones de ser transferido. La transferencia del DNA se realizó mediante capilaridad, la que consistió básicamente en preparar una bandeja de vidrio, sobre la cual se colocó una superficie de vidrio y sobre ella un papel filtro Whatman de 3 mm saturado previamente con una solución de buffer SSC 2x (Maniatis, 1982) que cumplía las funciones de puente. Sobre este papel filtro se colocó el gel con los pocillos hacia abajo. Luego, sobre el gel se colocó la membrana de nylon Hybond-N+ Armenshaim de 8 x 20 cm y sobre ésta, un papel filtro de las mismas dimensiones y seguido de papel absorbente (3 paquetes de servilletas desplegadas) para colocar finalmente una superficie de vidrio. Sobre él, se colocó un peso aproximado de 1 a 1.5 Kg., depositando finalmente dentro de la bandeja una solución de 500 ml de buffer SSC 2x transfiriendo toda la noche a temperatura ambiente. La membrana se irradió bajo luz ultravioleta UVC 500, con el objeto de fijar el DNA transferido.

M. Marcación radioactiva de la sonda

Este procedimiento fue llevado a cabo gentilmente por el Dr. Aldo Solari (Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile). La sonda de DNA kinetoplastídico de *T. cruzi* fue marcada utilizando el kit de marcación Rediprime de Amersham. Inicialmente el DNA fue desnaturalizado por calentamiento y enfriado rápidamente en hielo. Se agregó 45

μl de una solución que contenía 1 μl del fragmento Klenow de la DNA polimerasa I, 10 μl de dCTP marcado con P³², oligonucleótidos al azar y buffer de reacción incorporado al kit.

N. Hibridación con la sonda radioactiva

Anterior a la hibridación misma, las membranas fueron pre-hibridadas por 2 horas a 68°C con una solución de hibridación (buffer SSC 5x, reactivo bloqueador 0.5% p/v, lauril sarcosinato de sodio 0.1% y SDS 0.02% p/v), la que fue introducida en botella de hibridación. Luego de esta incubación, se eliminó gran parte de la solución de hibridación y se agregó a las botellas, 2.5 ml de solución fresca de hibridación que contenía la sonda de DNA marcada con dCTP-P³², previamente desnaturalizada. Las membranas se incubaron toda la noche a 68°C en horno de hibridación. Posteriormente, las membranas fueron lavadas dos veces por 5 min a temperatura ambiente con 50 ml de solución SSC 2x y SDS 0.1% y dos veces por 15 min a 68°C, en una solución de SSC 0.1x y SDS 0.1%. Finalmente, las membranas fueron expuestas a autoradiografía entre 2 a 48 hrs a -80°C y revelada para su análisis (solución de revelado por 5 min hasta aparición de bandas, solución fijadora por 5 minutos, lavado final con agua destilada y secado a temperatura ambiente). La banda amplificada de 330 pb, que representa la

región hipervariable de los minicírculos amplificados, fue así detectada con la sonda de DNA kinetoplastídico.

O. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron mediante tests de Chi-cuadrado, Fisher, Diferencias de Porcentajes (prueba Z), Prueba de Proporciones y Prueba de Diferencia de Promedios (Test de Wicolxon para pruebas dependientes). Se estableció como aceptable, un nivel de significación máximo de 0,05. Para el análisis de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS (System Package Statistical Science) (Pagano y Gauveard, 2001).

VI. RESULTADOS

1. Ensayos de PCR e hibridación de los productos amplificados

La detección de kDNA de *T. cruzi* se consideró positiva cuando la banda de 330 pb fue evidente mediante PCR e hibridación (Figura 3) o en pocos casos, cuando PCR fue negativo y la hibridación fue positiva. Esos criterios fueron aplicados sobre la base de la descripción de la mayor sensibilidad y especificidad de los ensayos de hibridación que utiliza sondas radioactivas en lugar de la tinción con bromuro de etidio (Breniere y cols, 1998).

En 6 de los 15 casos con XD negativo después del tratamiento con Itraconazol, el PCR fue positivo, en los 9 casos restantes que fueron negativos por PCR, *T. cruzi* fue detectado por ensayos de hibridación. Los promedios muestran que el 40% de las muestras con XD negativo tuvieron PCR positivo, porcentaje que se incrementó hasta el 60% cuando se aplicaron ensayos de hibridación. Estos resultados fueron estadísticamente significativos, comparados con aquellos obtenidos por XD ($p < 0.0001$).

En el Grupo II, compuesto por individuos con XD positivo después del tratamiento con Itraconazol, PCR fue positivo en 9 de 11 casos y todos fueron confirmados por hibridación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas cuando se compararon estos resultados con los obtenidos mediante XD.

En el Grupo III (XD negativo después del tratamiento con Alopurinol), 9 de 15 casos fueron positivos por PCR, 8 de los cuales también fueron positivos en los ensayos de hibridación. Cuando se compararon los resultados de PCR e hibridación con los obtenidos por XD, se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$).

En el Grupo IV, de 11 pacientes con XD positivo después del tratamiento con Alopurinol, 9 de ellos fueron positivos por PCR y ensayos de hibridación, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a los resultados de XD (Tabla 1).

En los 4 casos pertenecientes a los grupos controles III y IV, en que no se detectó kDNA de *T. cruzi* por PCR o hibridación, se utilizó PCR con los primers del gen de β -globina humana (Britto et al, 1995 a), con resultados positivos en todos los casos. Lo que demuestra que tanto el PCR como el contenido de DNA de la muestra manera eran correctos.

En 40 de las 52 muestras evaluadas (70%) fue realizado un PCR a ciegas, sin conocimiento de los resultados previos en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con un 90% de concordancia. Los cuatro casos discordantes pertenecían al Grupo I (3 casos) y al Grupo III (1 caso).

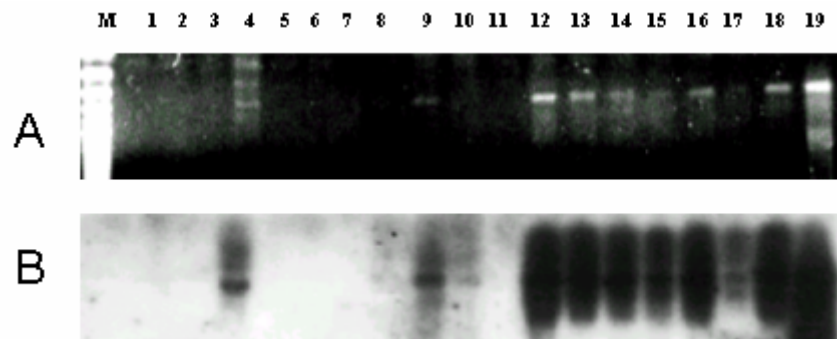
Tabla 1

Detección de la banda de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR e hibridación con sondas de kDNA total del parásito marcadas con P^{32} , en sangre periférica de 52 chagásicos crónicos tratados y clasificados de acuerdo a XD y fármaco recibido

Grupo	N	Fármaco	XD Post-terapia	PCR + n (%)	Hibridación + n (%)
I	15	Itraconazol	Negativo	6 (40)	9 (60)
II	11	Itraconazol	Positivo	9 (81.8)	9 (81.8)

III	15	Alopurinol	Negativo	9 (60)	8 (53)
IV	11	Alopurinol	Positivo	9 (81.8)	9 (81.8)

Figure 3



A. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio en el que se observa la banda de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi* detectada con los primers 121 y 122 en la sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos. B. Membrana de nylon con el DNA transferido mediante Southern blot de los mismos pacientes chagásicos crónicos. Se observa la banda de 330 pb detectada mediante sonda de kDNA total del parásito marcada con P³². Los carriles 2 al 18 corresponden a 17 pacientes con resultados de PCR positivo o negativo. El carril 19 corresponde al control positivo y M corresponde al marcador de peso molecular (100 pb).

2. Correlación entre la condición parasitológica de chagásicos crónicos tratados en seguimiento prolongado, establecida mediante XD, PCR e hibridación y la evolución (regresión o prevención) de las alteraciones electrocardiográficas

Como se ha descrito previamente en Material y Métodos, para cumplir este objetivo, el criterio de inclusión de pacientes fue la positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) de XD, PCR e hibridación.

En la Tabla 2 se observa, que al inicio del tratamiento, el 59% de los pacientes del Grupo I tenía un ECG normal (10 de 17), en comparación con el 62% del Grupo II (8 de 13) ($p>0.05$).

Seis años después del tratamiento, el porcentaje de pacientes con ECG normal fue del 76% (13 de 17) en el Grupo I y del 77% (10 de 13) en el Grupo II ($p>0.05$). De los chagásicos con ECG normal antes del tratamiento, sólo uno del Grupo I (10%) y uno del Grupo II (13%) alteraron su ECG.

Por otra parte, el 58% (4 de 7) de los chagásicos del Grupo I que tenían ECG alterado antes del tratamiento, evidenciaron regresión de las alteraciones electrocardiográficas en comparación con el 60% (3 de 5) del Grupo II.

En relación a los cambios favorables globales, como se observa en la Tabla 3, el 58% (7 de 12 casos) de los chagásicos con ECG alterado antes del tratamiento, revirtieron su ECG a un perfil normal, en comparación con el 11% (2 de 18 casos) que progresó a un ECG alterado ($p < 0.05$).

En la Tabla 4 se detallan las alteraciones específicas del trazado electrocardiográfico observadas en 14 chagásicos crónicos antes y/o 7 años después de concluida la quimioterapia con Itraconazol o Alopurinol.

Las reversiones del ECG alterado a normal, se produjeron en todos los casos antes del año de concluida la terapia. Por el contrario, la aparición de las alteraciones electrocardiográficas descritas en los 14 casos, se registraron dentro de los tres primeros años post-tratamiento y se han mantenido en el período de seguimiento.

No se registró mortalidad por enfermedad de Chagas en el grupo de pacientes evaluados.

Tabla 2

Evolución del trazado electrocardiográfico en chagásicos crónicos con XD, PCR e hibridación positiva (Grupo I) o negativa (Grupo II).
Siete años post-terapia.

	Pre-Terapia				Pre-Post-Terapia				Post-Terapia								
	N*		A**		N-N		A-A		N-A		A-N		N		A		
	N	n	%	n	%	n	%	N	%	N	%	n	%	n	%		
Grupo I	17	10	59***	7	41	9	90	3	43	1	10	4	58	13	76***	4	24
Grupo II	13	8	62****	5	38	7	88	2	40	1	13	3	60	10	77****	3	23
Total	30	18	60	12	40	16	89	5	42	2	12	7	59	23	77	7	23

* N: ECG normal
 ** A: ECG alterado
 *** p > 0.05
 **** p > 0.05

Tabla 3

Comparación de la mejoría del ECG inicial con la alteración del ECG al finalizar el estudio en 30 chagásicos crónicos. Siete años post-terapia

ECG inicial (Pre-Terapia)	ECG final (Post-Terapia)				
	Alterado		Normal		Total
	Nº	%	Nº	%	N
Alterado	5	42	7	58*	12
Normal	2	11*	16	89	18

* p < 0.05

Tabla 4

Sexo, edad y alteraciones electrocardiográficas específicas pre y post-terapia. Observadas en 14 chagásicos crónicos tratados con Itraconazol o Alopurinol. Evaluados 7 años post terapia

Sexo	Edad*	ECG ** Pre-Terapia		ECG ** Post-Terapia	Grupo	N
M	50	N ^a	Itra	ISQ ^b	I	1
M	32	N	Alo	EXT VENT ^c	II	1
F	10,24,20	QTP ^d	Alo (3)	N	I, I, II	3
M	47	BIRD ^e	Alo	N	II	1
M	13	HBAI ^f	Itra	N	II	1
F	23	RIT NOD ^g	Alo	N	I	1
M	31	HBAI+BIRD ^h	Itra	N	I	1
F	44	HBAI	Itra	HBAI	I	1
M	31	HBAI+BCRD ⁱ	Itra	HBAI	I	1
F	44	HBAI+BAV ^j	Alo	HBAI	II	1
F	49	HBAI+ISQ ^k	Itra	HBAI+ISQ	II	1
F	47	HBAI+ISQ	Itra	HBAI+ISQ+QT ^l	I	1

^aECG normal

^bIsquemia

^cExtrasístole ventricular

^dQT prolongado

^eBloqueo incompleto de rama derecha

^fHemibloqueo anterior izquierdo

^gRitmo nodal

^hHemibloqueo anterior izquierdo + Bloqueo incompleto rama derecha

ⁱHemibloqueo anterior izquierdo + Bloqueo completo rama derecha

^jHemibloqueo anterior izquierdo + Bloqueo aurículo ventricular

^kHemibloqueo anterior izquierdo + Isquemia

^lHemibloqueo anterior izquierdo + Isquemia + QT prolongado

* Al inicio de la terapia

** p > 0.05

3. Sensibilidad y precocidad de la detección de la banda de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de *Triatoma infestans* utilizados en el XD y alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos

La muestra en estudio estuvo conformada por 50 individuos chagásicos crónicos, 25 XD positivo (Grupo I) y 25 XD negativo (Grupo II). Según se describió previamente, a

las deyecciones de triatominos incubadas durante 30, 60 y/o 90 días, se les realizó observación microscópica en búsqueda de las formas tripomastigotas móviles de *T. cruzi* (XD) y se les aplicó posteriormente PCR para detectar kDNA del parásito. En el Grupo I, el XD fue positivo a los 30 días en 11 casos (44%), en 21 casos (84%) a los 60 días y en 19 casos (76%) a los 90 días de incubación de los triatominos, mientras que PCR fue positivo en todos los casos a los 60 días. El análisis estadístico revela que PCR detecta al parásito en forma significativamente más precoz que el XD ($p=0,0001$).

En el Grupo II, se detectó la banda de 330 pb de *T. cruzi* mediante PCR en el 36% de los casos (Tabla 5). Al evaluar la concordancia entre PCR y XD, los mayores porcentajes se obtienen a los 60 días (84%) en el Grupo I y a los 30 días (80%) en el Grupo II.

La mayor complementariedad entre ambas técnicas se obtiene a los 30 días en el Grupo I, en que el 48% de los casos tiene PCR positivo y XD negativo.

En cuanto a la precocidad de PCR, en 16 casos (64%) del Grupo I se detecta *T. cruzi* antes que el XD de 90 días. En 12 de ellos, el PCR fue positivo a los 30 días y el XD fue positivo a los 60 y/o 90 días y en los otros 4 casos, el PCR fue positivo a los 60 días, mientras que el XD sólo se hizo positivo a los 90 días (Tabla 6).

Al analizar la secuencia de resultados del Grupo I, según período de incubación, se observó que el 92% de los casos tuvo PCR positivo a los 30, 60 y 90 días, en comparación con 6 casos (24%) que tuvieron resultados positivos a la observación microscópica en los tres períodos (Tabla 7).

En la Figura 3, se observa la banda de 330 pb de kDNA de *T. cruzi* detectada en algunos de los casos analizados mediante PCR en los diferentes períodos de incubación. También se observan ensayos de hibridación que fueron realizados en algunos casos para

confirmar la presencia de *T. cruzi* (Figura 5). La concordancia para los casos analizados mediante las dos técnicas fue del 100%.

Tabla 5

Positividad de PCR según períodos de incubación, en muestras de deyecciones de triatomíneos alimentados sobre 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I) y 25 chagásicos crónicos con XD negativo (Grupo II)

	Grupo I		Grupo II
	XD (+) n	PCR (+) N	XD (-) PCR (+) N
30 días*	11 (44%)	23 (92%)	5 (20%)
60 días**	21 (84%)	25(100%)	6 (24%)
90 días**	19 (76%)	24 (96%)	9 (36%)

* p=0,001

** p>0,01

Tabla 6

Concordancia, complementariedad y precocidad de resultados de PCR. En muestras de deyecciones de triatomíneos alimentados sobre 25 chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I) y 25 chagásicos crónicos con XD negativo (Grupo II)

Períodos incubación triatomíneos	Concordancia		Complementariedad		Precocidad
	Grupo I XD(+) PCR (+) n	Grupo II XD (-) PCR (-) n	Grupo I XD(-) *PCR (+) N	Grupo II XD(-) PCR (+) N	Grupo I XD(-) *PCR (+) n
30 días	11 (44%)	20 (80%)	12 (48%)	5 (20%)	12 (48%)*

60 días	21 (84%)	19 (76%)	4 (16%)	6 (24%)	4 (16%)**
90 días	19 (76%)	16 (64%)	5 (25%)	9 (36%)	-

* XD positivo a los 60 y/o 90 días

** XD positivo a los 90 días

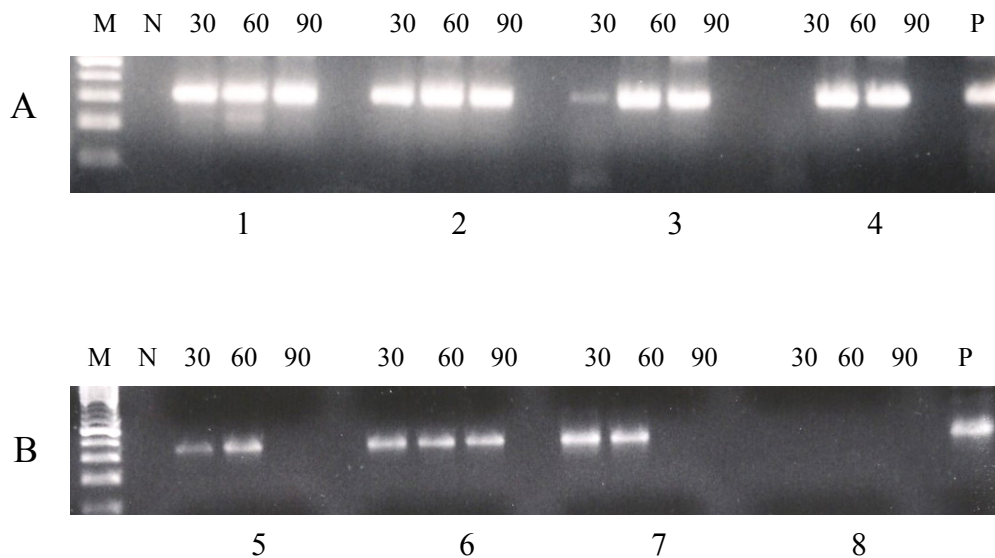
Tabla 7

Secuencia de resultados de XD y PCR en deyecciones de triatominos aplicados en 25 individuos chagásicos crónicos con XD positivo (Grupo I) según período de incubación

Períodos de incubación (días)			XD		PCR		p
30	60	90	N	%	n	%	
(-)	(+)	(+)	9	36	1	4	0,0120*
(+)	(+)	(+)	6	24	23	92	0,0004*
(+)	(+)	(-)	5	20	0	0	0,3320
(-)	(-)	(+)	4	16	0	0	0,5000
(-)	(+)	(-)	1	4	1	4	0,5000

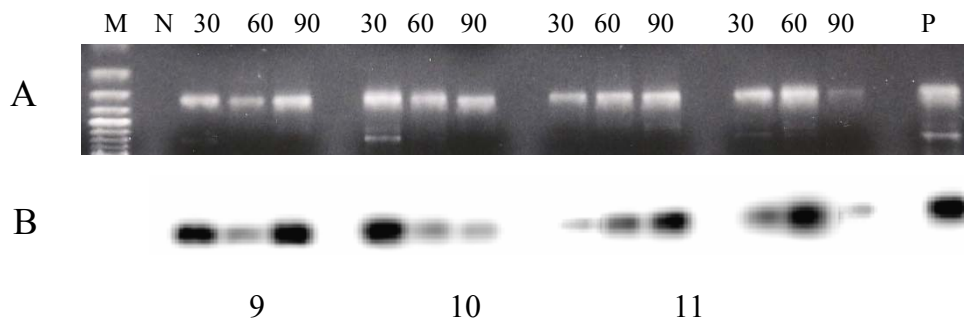
* significativo

Figura 4



Amplificación de la banda de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de triatominos utilizados en el XD y aplicados a pacientes chagásicos crónicos. Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio con banda de 330 pb correspondiente al amplificado de kDNA del *T. cruzi*. Muestras de 8 pacientes (Gel A: 1-4 y Gel B: 5-8) en los diferentes períodos de incubación de los triatominos utilizados en el XD (30, 60 y 90 días) M: marcador 100 pb N : control negativo PCR P : control positivo kDNA *T. cruzi*.

Figura 5



Amplificación de la banda de 330 pb de kDNA de *Trypanosoma cruzi* en deyecciones de triatominos utilizados en el XD aplicado a pacientes chagásicos crónicos por PCR. A: Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio con banda de 330 pb correspondiente al amplificado de kDNA del *T. cruzi*. B: Hibridación de los productos de amplificación de PCR con sonda de kDNA de *T. cruzi*. Muestras de 4 pacientes (9-12) en los diferentes períodos de incubación de los triatominos utilizados en el XD (30, 60 y 90 días) M: marcador 100 pb N : control negativo PCR P : control positivo kDNA *T. cruzi*.

4. Asociación entre la condición parasitológica determinada mediante PCR y XD y algunos antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intradomiciliario de *Triatoma infestans* en chagásicos crónicos tratados.

En el año 1992, como se observa en la Tabla 8, el 89,2% de los encuestados manifestó conocer a los triatomíneos, el 18,9% refirió presencia de *T. infestans* en el domicilio actual y el 83,3% tenía la seguridad de haber sido picado por ellos. En relación a la vivienda, el 48,6% de los muros de las habitaciones de los pacientes chagásicos eran de adobe, el 13,5% de cemento o adobe estucado y el 29,7% de madera. En relación al material del techo de la vivienda, el 59,5% era de zinc, el 27% de pizarreño y el 10,8% de quincha (paja y barro). En la encuesta aplicada a los mismos pacientes en el año 2002, se mantuvo el porcentaje en relación al conocimiento del vector (89,2%), ninguno de los casos reportó presencia de *T. infestans* domiciliario o peri-domiciliario ($p=0,0086$) y el 81,8% manifestó haber sido picado por las vinchucas. Con respecto al material de los muros de las habitaciones en el año 2002, sólo el 8,1% era de adobe ($p=0,00001$), el 48,6% de madera ($p=0,0086$) y el 32,4% de concreto o adobe estucado ($p=0,0086$). Para el mismo período, no se reportaron techos de quincha ($p>0,05$).

En la Tabla 9, se observan los resultados de la evaluación parasitológica realizada en los mismos pacientes encuestados, diez años después de concluida la terapia con Alopurinol o Itraconazol. Se detectó la presencia de *T. cruzi* en 33 de los 37 casos encuestados (89,2%) al utilizar XD, PCR o ambas técnicas en forma simultánea. Las sensibilidades obtenidas para los dos métodos fueron de 37,8% (14/37) y 88,2% (19/34) para XD y PCR, respectivamente.

Tabla 8

Antecedentes epidemiológicos de 37 chagásicos crónicos procedentes de zonas rurales de la IV Región, Chile, tratados con Alopurinol o Itraconazol en condiciones de pre-terapia (año 1992) y diez años después de concluida la terapia (año 2002)

	1992		2002		Valor P
	N	%	N	%	
Conoce las vinchucas					
Si	3	89,2	33	89,2	p>0,05
No	4	10,8	4	10,8	
Existen en el domicilio actual					
Si	7	18,9	0	0,0	P=0,0086
No	3	81,1	37	100,0	
Ha sido picado por vinchucas					
Si	3	83,8	30	81,8	p>0,05
No	6	16,2	7	18,2	
Paredes de la vivienda					
Adobe	1	48,6	3	8,1	P=0,00001
Cemento o adobe estucado en cemento	5	13,5	12	32,4	P=0,0086
Ladrillo	1	2,7	1	2,7	p>0,05
Madera	1	29,7	18	48,6	P=0,0086
Volcanita	2	5,4	3	8,1	p>0,05
Techo de la vivienda					
Zinc	2	59,5	25	67,6	p>0,05
Pizarreño	1	27,0	12	32,4	p>0,05
Quincha	4	10,8	0	0,0	p>0,05
Madera	1	2,7	0	0,0	p>0,05

Tabla 9

Resultados de XD y PCR obtenidos en 37 chagásicos crónicos procedentes de zonas rurales de la IV Región, Chile, tratados con Itraconazol o Alopurinol en seguimiento prolongado (diez años post-terapia)*

N	XD	PCR	%
11	+	+	29,7
19	-	+	51,4
4	-	-	10,8
3	+	ND	8,1

* P>0,05

VII. DISCUSION

La enfermedad de Chagas crónica se caracteriza por parasitemia subpatente y escaso parasitismo celular (Gomes y cols, 1999). En esta fase, la utilidad de técnicas parasitológicas tales como el XD aplicado como herramienta de evaluación de eficacia quimioterapéutica es limitada, ya que la sensibilidad de la técnica depende de la densidad de parásitos en la sangre, que es variable (Britto y cols, 1995b; Junqueira y cols, 1996). Por esta razón, resultados negativos del XD no necesariamente indican ausencia de parasitemia o cura parasitológica posterior al tratamiento. El reciente uso de PCR para detectar *T. cruzi* en muestras de sangre periférica de pacientes chagásicos crónicos ha abierto nuevas posibilidades en el diagnóstico y evaluación del tratamiento anti-chagásico. El presente estudio desarrollado seis años después de la terapia (Objetivo 1) evidencia la presencia de kDNA de *T. cruzi* mediante PCR en el 40% de los pacientes tratados con Itraconazol y cuyos XD realizados al mismo tiempo que la extracción de sangre para PCR fueron negativos. Los resultados de PCR fueron confirmados por ensayos de hibridación en el 88.5% y 92.2% de los pacientes tratados con Itraconazol o Alopurinol, respectivamente. Esta alta concordancia entre ambos métodos en la detección de *T. cruzi* ha sido previamente descrita por otros autores (Breniere y cols, 1998; Gomes y cols, 1999). Tres muestras de pacientes tratados con Itraconazol, con PCR negativo, fueron capaces de detectar la banda de 330-pb con la sonda universal marcada con P³² (11.5%), demostrando que la hibridación es más sensible que la tinción con bromuro de etidio, como ya ha sido descrito previamente (Breniere y cols, 1998). En un caso tratado con Alopurinol, ocurrió la situación inversa, ya que la hibridación fue negativa aunque el PCR fue positivo. Este hecho podría deberse a una inadecuada transferencia del DNA amplificado a la membrana de nylon o a una insuficiente cantidad de DNA para la hibridación. Este caso fue considerado negativo por

los criterios de positividad establecidos en el presente estudio. Con respecto a los Grupos II y IV, cada uno constituido por 11 pacientes con XD positivo post-terapia, en 9 casos de cada grupo fue posible detectar DNA de *T. cruzi* (Tabla 1). Los dos casos negativos pertenecientes a cada grupo podrían ser explicados por la ausencia de parásitos en la muestra de sangre recolectada, sugiriendo de esta manera que el volumen de muestra podría ser un factor a ser considerado en pacientes chagásicos crónicos con bajos niveles de parasitemia. Otra explicación podría ser la presencia de inhibidores de la reacción de PCR. Esta posibilidad fue explorada bajo las mismas condiciones de amplificación en ensayos de PCR utilizando dos primers específicos de genes de β -globulina que fueron positivos a la amplificación. En este contexto, Junqueira y cols (1996) publicaron 4 casos cuyos XD fueron positivos y el PCR fue negativo, sugiriendo la presencia de inhibidores de PCR como una explicación a este hecho. Por otra parte, los mismos autores describen la evaluación de dos casos cuyo PCR fue negativo y evidenció amplificación al gen de β -globulina, concluyendo que esos resultados no fueron debidos a la inhibición de la reacción, situación también descrita por Britto y cols (1995a,1995b). Los resultados del presente estudio, muestran que las herramientas de biología molecular parecen ser más sensibles para demostrar la persistencia del parásito en evaluaciones quimioterapéuticas (Zulantay y cols, 2004b).

La demostración permanente de *T. cruzi* en individuos chagásicos crónicos, revela la importancia de la enfermedad de Chagas en el continente latinoamericano y mantiene abierta la discusión acerca de la eficacia y tolerancia de los fármacos utilizadas hasta hoy en el tratamiento etiológico de esta afección (OPS/OMS, 1999; Rodríguez Coura y Castro, 2002).

Existe consenso que la enfermedad de Chagas debe ser tratada en cualquiera de sus períodos, exceptuando los casos crónicos terminales (Junqueira y cols, 1996). No obstante, la evaluación de eficacia del tratamiento en la etapa crónica, aún constituye una problemática difícil de abordar. Si bien el desarrollo vertiginoso de la biología molecular ha permitido aumentar en forma considerable la sensibilidad de detección de *T. cruzi* en pacientes tratados (Junqueira y cols, 1996; Britto y cols, 2000), algunos autores estiman que la cura parasitológica no es viable de ser confirmada, aún con pruebas parasitológicas persistentemente negativas en seguimientos prolongados (Apt, 1999; Cançado, 1999). Los estudios sobre evolución clínica en chagásicos crónicos tratados son controvertidos y sin resultados concluyentes, siendo incluso descartado por algunos autores (Cançado, 1999), debido probablemente a la necesidad de realizar seguimientos muy prolongados y a lo incierto de la patogénesis de la enfermedad (Rodríguez Coura y Castro, 2002; Viotti y cols, 1994). Se ha sugerido también considerar como criterio de cura, períodos prolongados de negativización o disminución de títulos anti-*T. cruzi* determinados por técnicas serológicas convencionales (Rassi y Luquetti, 1992; Sosa y cols, 1998) y desaparición de anticuerpos contra formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi* detectados mediante ensayos de lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos (Zulantay y cols, 1998b) o citometría de flujo (Martins-Filho y cols, 1995).

En el presente estudio, se correlaciona la evolución electrocardiográfica (regresión y prevención de anormalidades) en chagásicos crónicos tratados con Itraconazol o Alopurinol y la condición parasitológica, siete años post-terapia. La conclusión más relevante, es que los efectos beneficiosos (prevención y regresión) de estos fármacos sobre la evolución del trazado electrocardiográfico, parecen ser independientes de la condición parasitológica. El 58% y 60% de reversión (ECG A/N) y el 90% y 88% de prevención

(ECG N/N) observadas en los Grupos I y II, respectivamente, no constituyen diferencias estadísticamente significativas, al comparar con el 12% global de progresión (ECG N/A). Los rangos de reversión de las alteraciones electrocardiográficas (ECG A/N) fueron mucho mayores que el 8.1% observado en el control histórico (Arribada y cols, 1996). Al término del período de seguimiento, un 76% y un 77% de los pacientes de los grupos I y II, mantienen su ECG normal (Tablas 2 y 3).

Nuestros resultados son concordantes a los obtenidos por Viotti y cols, que observan en individuos tratados con Benznidazol y evaluados durante 8 años post-terapia, una marcada reducción en el desarrollo de alteraciones electrocardiográficas y una menor frecuencia del deterioro de la condición clínica, a pesar de la persistencia de las pruebas parasitológicas positivas (Viotti y cols, 1994). En chagásicos no tratados, diversos estudios determinan que la parasitemia no se asocia a la evolución o condición clínica de los individuos chagásicos (Castro y cols, 2005; Monteon-Padilla y cols, 2001), mientras que otros autores, establecen una estrecha correlación entre la persistencia de *T. cruzi* y la progresión de la enfermedad (Castro y cols, 2005, Rangel-Flores y cols, 2001; Busqueira y cols, 2003).

Segura y Andrade, han verificado que Benznidazol interrumpe la progresión de lesiones inflamatorias en ratones y animales crónicamente infectados con *T. cruzi* (Segura y cols, 1994; Andrade y cols, 1991). Arribada y cols., estiman que cuando las anormalidades electrocardiográficas son iniciales, es posible la regresión. Conversiones de alteraciones menores tales como QT prolongado y bloqueo auriculo-ventricular de 1° y 2° grado, pueden ser observadas incluso, en ausencia de tratamiento. La intervención quimioterapéutica puede causar así, reversión de anormalidades más severas, tales como bloqueos fasciculares y bifasciculares, modificando la historia natural de la enfermedad (Arribada y cols, 1993).

En el presente estudio, las alteraciones que retornaron a la normalidad, sugieren que eran de corta evolución, pues revirtieron en los primeros años de tratamiento.

El patrón inmunogenético del hospedador y la demostrada heterogeneidad de las poblaciones circulantes de *T. cruzi*, podrían ser factores que den cuenta de la independencia observada entre evolución clínica y parasitemia. Murta y cols, describen mayor susceptibilidad a Benznidazol y Nifurtimox en cepas de *T. cruzi* de perfil heterocigoto (zimodema B), predominante en áreas geográficas donde el tratamiento ha sido más efectivo (Murta y cols, 1998). Toledo y cols, evidencian una fuerte correlación entre la divergencia filogenética de *T. cruzi* y su susceptibilidad a los fármacos *in vivo*. Aislados de genotipos 19 y 20 (*T. cruzi* I) fueron altamente resistente a ambos fármacos, mientras que los genotipos 39 y 32 (*T. cruzi* II) fueron parcialmente resistentes, a pesar de la susceptibilidad de Itraconazol durante la fase crónica de la infección (Toledo y cols, 2003).

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir, que la evaluación de eficacia quimioterapéutica en la enfermedad de Chagas crónica podría considerar, además de los criterios parasitológicos, los efectos benéficos de los fármacos sobre la regresión o prevención de anomalías electrocardiográficas. El establecimiento de indicadores predictivos de una respuesta terapéutica eficaz, nos permitirá disminuir el impacto de progresión de la enfermedad de Chagas crónica.

La técnica de PCR se ha constituido en una poderosa herramienta, que aplicada en sangre periférica (Britto y cols, 2001; Maldonado y cols, 2004), suero (Russomando y cols., 1992), tejidos (Aufderheide y cols, 2004; Shijman y cols, 2000; Freitas y cols, 2005) y deyecciones de triatomos (Breniere y cols, 2002; Torres y cols, 2004; Zalloum y cols, 2005) entre otras muestras biológicas, ha permitido aumentar significativamente los porcentajes de detección de *T. cruzi*. No obstante estos avances, el XD aún es considerado

un eficiente método de diagnóstico parasitológico, especialmente en la fase crónica de la afección (Schenone, 1999a; Schenone y cols, 1999b). La buena sensibilidad de las ninfas de *T. infestans* para detectar *T. cruzi* en sangre periférica de diversos hospedadores infectados, determinada por la importante capacidad de ingestión de sangre y la alta tolerancia a la manipulación por parte del examinador, han permitido su uso en el XD (Schenone, 1985; Schenone y cols, 2000). Es así como ha sido posible, utilizando deyecciones de triatomíneos, evaluar la distribución de genotipos clonales en *T. infestans* (Bosseno y cols, 1996), demostrar la considerable variabilidad biológica de *T. cruzi* (Revollo y cols, 1998) y caracterizar mediante esquizodemas y análisis de Southern, aislados obtenidos de *T. infestans* y pacientes chagásicos de diversas procedencias geográficas, confirmando la heterogeneidad de las poblaciones de *T. cruzi* (Solari y cols, 1992, Torres y cols, 2004). No obstante estas ventajas, se ha evidenciado que casi la mitad de las infecciones biclonales no son detectadas por XD al concluir la metacicloénesis, existiendo importantes diferencias en la detección según el genotipo de los clones. El hecho que *T. infestans* no reproduzca diferentes genotipos con la misma eficiencia, tendría fuertes implicaciones para la confiabilidad del XD. Aún así, el uso de PCR y posterior hibridación de los productos amplificados con sondas de kADN de *T. cruzi* evitan la fase de cultivo, lo cual hace la detección de infecciones mixtas mucho más sencilla (Da Silveira Pinto y cols, 2002).

Otra aplicación de interés epidemiológico, es la utilización de heces de triatomíneos silvestres, peri-domiciliarios y domésticos para determinar los índices de infección por *T. cruzi* (Osherov y cols, 2003, Guevara y cols, 2005). La demostración del 60% de infección en *T. infestans* domiciliarios y 12.7% en vectores silvestres, mediante microscopía y PCR, confirman la importancia de la utilización de este tipo de muestra biológica (Bar y cols, (2002).

En el presente estudio, el PCR ha sido aplicado en las deyecciones de triatominos alimentados con sangre periférica mediante XD, es decir, hemos dado la posibilidad que el vector natural realice una primera etapa de amplificación, seguida de una segunda etapa de amplificación aplicando PCR. El 100% de los casos XD positivo (Grupo I), fue PCR positivo, mientras que en el Grupo II, constituido por pacientes XD negativo, probablemente con muy bajos niveles de parasitemia, el 36% de ellos tuvo PCR positivo (Tabla 5). Al aplicar ambas técnicas en forma independiente, se ha demostrado la mayor sensibilidad de PCR en sangre periférica sobre XD, con porcentajes del 90% y 43%, respectivamente (Britto y cols, 1995a). En pacientes tratados, se han obtenido resultados negativos para PCR y XD en el 73% y 86% de casos agudos y en el 65% y 83% de casos crónicos, respectivamente, mientras que en pacientes tratados con placebo, un 73% de ellos tuvo XD negativo y un 36% PCR positivo (Britto y cols, 2001).

La mayor concordancia entre resultados positivos a la observación microscópica y al PCR, se obtuvo a los 60 días de incubación de los triatominos (84%) (Tabla 6). Estudios previos describen concordancias que fluctúan entre el 77.5% y 89.3% al comparar la observación directa y PCR en deyecciones de triatominos. La probable explicación a la discordancia la dan los mismos autores, quienes señalan que puede ser debida a la falta de purificación del DNA de las muestras fecales contaminadas por productos de la sangre y bacterias en las heces del insecto (Breniere y cols, 1999).

En la etapa crónica de la enfermedad de Chagas crónica, la parasitemia puede tener bajos o altos niveles en diferentes individuos y es de carácter variable y fluctuante (Schenone, 1999b). Castro y cols, (1999), evaluaron a 202 chagásicos crónicos durante 13 años mediante repetidos XD y determinaron que las parasitemias fueron altas, medianas y bajas. Por otra parte, Cançado (1999), señala que resultados negativos de XD pueden

reflejar períodos de ausencia o baja parasitemia. El XD actúa como un medio de cultivo biológico para amplificar *T. cruzi* (Schenone, 1999a) de tal manera que los casos del presente estudio que tuvieron XD negativo y PCR positivo, serían reflejo de la capacidad que tuvieron los triatomínicos para amplificar el parásito que se encontraría en muy bajos niveles en la sangre periférica.

En nuestro estudio, un caso presentó XD y PCR negativo a los 90 días (Tabla 7) habiendo sido positivo para ambas técnicas a los 30 y/o 60 días de incubación de los triatomínicos. Este hecho puede deberse a triatomínicos infectados por *T. cruzi* que murieron durante el proceso de incubación, representando una de las limitaciones del método (Schenone, 1999a). Una proporción de triatomínicos utilizado en el XD muere durante el período de mantenimiento en el laboratorio previo al análisis microscópico de deyecciones, proporción que alcanza el 7.7%. La mortalidad puede subir drásticamente al 87% cuando los triatomínicos son incubados durante 120 días (Schenone y cols, 2000).

El presente estudio valida la precocidad de PCR en muestras positivas para XD. Independiente del período de incubación en que se comparen ambas técnicas, PCR tiene mejores porcentajes de positividad y detecta precozmente a *T. cruzi*, como se observa a los 30 días, en que se obtiene un 92% de positividad para PCR y 44% para XD ($p=0,005$). El ciclo completo de *T. cruzi* en el triatomíno dura entre 15-60 días, al término del cual es posible detectar el parásito en las deyecciones del insecto, sobre todo en aquellos que presentan un tasa de metacicloogénesis alta, que corresponde a la tasa de transformación de las formas epimastigotes a formas tripomastigotes metacíclicas (Brener y cols, 2000).

Estos resultados permiten postular que la técnica de PCR es una herramienta complementaria del XD, puesto que sumado a la mayor sensibilidad y precocidad de PCR,

es el XD el que cumple la función biológica natural de amplificar *T. cruzi*. Por estas razones, ambas técnicas son complementarias.

El último objetivo específico de la presente investigación, aborda la utilización del PCR en chagásicos crónicos desde el punto de vista epidemiológico. El Programa Nacional del Control del Vector de la enfermedad de Chagas en Chile, impulsado por el Ministerio de Salud, se inicia en el Servicio de Salud Coquimbo en el año 1980, permitiendo mantener bajo control la presencia de *T. infestans* en el 80% de las viviendas de áreas endémicas, con una reinfección promedio del 3,4% (Correa, 1991; Valdés, 1991). El Programa Intergubernamental del Cono Sur para la Eliminación de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas (OPS, 1992), consolidó tales esfuerzos. El presente estudio, realizado en zonas rurales de la IV Región de Chile, evidencia un importante porcentaje de pacientes en los cuales se ha comprobado la infección por *T. cruzi*, conoce a los triatominos y refiere haber sido picado por ellos. Todos aquellos casos, que en la encuesta aplicada en el año 1992, declararon infestación domiciliaria por triatominos, fueron estimulados a realizar la denuncia correspondiente para concretar la intervención del Programa sobre el Ambiente. Tras ese hecho, la totalidad de los afectados, informa que se realizaron actividades de investigación triatomínica, ataque y vigilancia, logrando erradicar el insecto en sus domicilios y peridomicilios en un período no inferior a dos años. Es así como, en el año 2002, tal como se observa en la Tabla 8, el 100% de los casos reporta ausencia de *T. infestans* en sus viviendas. Con respecto a la información entregada por los encuestados en relación a la picadura por los triatominos, es posible que el 16,2% que manifiesta no haber tenido contacto con el vector, y aún así, estar infectados por *T. cruzi*, se deba a transmisión transplacentaria y transmisión vectorial que no fue percibida por el infectado (edad, hábitos nocturnos del triatomino, picadura indolora,

ausencia de lesiones cutáneas, etc). Por otra parte, es interesante observar los cambios que durante la década 1992-2002, tuvo el material de construcción de muros y techos de las viviendas de los pacientes encuestados. En el año 1992, un 48,6% de los casos vivía en casa de adobe. Por el contrario, en el año 2002, un 32,4% poseen viviendas con paredes de cemento o adobe estucado y un 48,6% paredes de madera. Tal situación se ha visto favorecida por políticas de vivienda desarrolladas para el área rural en Chile, que presentaban graves deficiencias en infraestructura (materialidad o saneamiento) (Mideplan, 1998). El otorgamiento de subsidios rurales permitió que dicho déficit disminuyera al 9,9% en el año 1998, en comparación con el 16,7% informado para el año 1990 (Mideplan, 2000). Junto a ello, la cobertura de viviendas rurales electrificadas en la IV Región ascendió de un 54% a un 79% entre los años 1992 y 2002 (Comisión Nacional de Energía. Chile, 2002).

Después de 10 años post-terapia (año 2002), todos los pacientes mantienen la serología convencional positiva (IFI y ELISA) y en el 89,2% de los casos se evidencia mediante XD, PCR o ambos, la persistencia de *T. cruzi* circulante (Tabla 9). La mayor sensibilidad de PCR en comparación con XD obtenida en el presente estudio, ya ha sido previamente citada (Chiari, 1999; Coura y Castro, 2002), validando su uso como herramienta de evaluación de eficacia quimioterapéutica (Solari y cols, 2001b; Zulantay y cols, 2004; Britto y cols, 2001). Al correlacionar los resultados epidemiológicos y parasitológicos, diez años después de concluida la terapia, es posible sostener, que la persistencia de la parasitemia no está directamente relacionada con la exposición a *T. infestans* intradomiciliario, puesto que en comparación con el año 1992, las condiciones favorables para su desarrollo por efectos de los Programas de Control del Vector y mejoramiento de la vivienda rural, se han visto disminuidas (Zulantay y cols, 2004a). No

obstante, estos resultados no son suficientes para determinar la real eficacia de los fármacos antichagásicos en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas, puesto que sería necesario considerar otros aspectos relevantes tales como, la cuantificación de kDNA de *T. cruzi* en condiciones de pre y post-terapia, evaluación de la eventual cepa-especificidad a fármacos recientemente descrita en estudios experimentales (De Ornelas y cols, 2003) y el establecimiento de la existencia o ausencia de correlación entre la parasitemia y la evolución clínica en seguimiento prolongado post-terapia.

VIII. CONCLUSIONES

La Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR) y la posterior hibridación de productos amplificados, constituyen herramientas más sensibles que el Xenodiagnóstico para detectar *Trypanosoma cruzi* en individuos chagásicos crónicos tratados y evaluados parasitológicamente en seguimiento prolongado.

La presencia de *Trypanosoma cruzi* detectada mediante PCR, hibridación y Xenodiagnóstico, no se asocia a la evolución (regresión o prevención) de las anomalías electrocardiográficas determinadas en pacientes chagásicos crónicos.

La detección del kDNA de *Trypanosoma cruzi* mediante PCR en deyecciones de triatominos aplicados en Xenodiagnósticos en pacientes chagásicos crónicos, es más sensible y precoz que la observación microscópica.

El Xendiagnóstico y el posterior PCR aplicado en deyecciones de triatominos alimentados sobre pacientes chagásicos crónicos mediante Xenodiagnostico, constituyen herramientas complementarias.

No existe asociación entre la condición parasitológica determinada mediante PCR y Xenodiagnóstico, con los antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intradomiciliario de *Triatoma infestans* en chagásicos crónicos tratados.

IX. BIBLIOGRAFIA

Aguilera, X.; Apt, W.; Arribada, A. 1987. Evaluación del alopurinol en la enfermedad de Chagas crónica humana en Chile. *Parasitol al Día* 11: 132-134.

Andrade, SG.; Stocker-Guerret, S.; Pimentel, AS. 1991. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86: 187-200.

Apt, W. 1991. Enfermedad de Chagas. En: Atías, A.; Neghme, A. Parasitología Clínica. 3º Ed. Santiago de Chile. Edit. Mediterráneo. Pág. 255-258.

Apt, W. 1999. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día* 23:100-112.

Apt, W. y Reyes, H. 1990. Algunos aspectos de la enfermedad de Chagas en Latinoamérica. *Parasitol al Día* 14: 23-40.

Apt, W.; Aguilera, X.; Arribada, A.; Perez, C.; Miranda, C.; Sánchez, G.; Zulantay, I.; Cortés,P.; Rodríguez,J.; Juri,D. 1994. Tratamiento de la enfermedad de Chagas humana crónica con itraconazol y alopurinol. Informe Preliminar. *Rev Med Chil* 122: 420-427.

Apt, W.; Aguilera, X.; Arribada, A.; Perez, C.; Miranda, C.; Sánchez, G.; Zulantay, I.; Cortés,P.; Rodríguez,J.; Juri,D. 1998. Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 59: 133-138.

Apt, W.; Arribada, A.; Zulantay, I.; Sánchez, G.; Vargas, S.; Rodríguez, J. 2003. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American tripanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol* 97(1): 23-29.

Arancibia, C. 1998. Perfil epidemiológico y comparativo de métodos directos de diagnóstico de infección chagásica en donantes de sangre. Tesis para optar al título de Tecnólogo Médico. Facultad de Medicina. Universidad de Chile. 58 pág.

Arribada, A.; Apt, W.; Ugarte, J. 1986. A four year follow-up survey of chagasic cardiopathy in Chile. *Bull Pan American Health Org* 20: 254-266.

Arribada, A.; Apt, W.; Aguilera, X.; Solari, A.; Ugarte, J.M.; Sandoval, J; Arribada, M. 1993. Cardiopatía chagásica en Chile. *Cardiol Int* 2:94-99.

Atías, A. 2000. Parasitología Médica. Editorial Mediterráneo. Pág. 251-264.

Aufderheide, A.C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F.; Arriaza, B.; Renier, C.; Wittmers, L.E. Jr.; Fornaciari, G.; Allison, M. 2004. A 9000-years record of Chagas disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 101 (7):2034-2039.

Avila, H.A.; Sigman, DS.; Cohen, L.M.; Millikan, R.C.; Simpson, L. 1991. Polymerase Chain Reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biol Parasitol* 48: 211-222.

Ayala, F.J. 1993. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol Res* 26(1-2): 47-63.

Bar, ME.; Pieri Damborsky, M.; Oscherov, E.B.; Milano, A.; Francisco, M.; Avalos, G.; Wisnivesky-Colli, C. 2002. Triatomines involved in domestic and wild *Trypanosoma cruzi* transmission in Concepción, Corrientes, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1):43-6.

Bosseno, M.F.; Telleria, J.; Vargas, F.; Yaksic, N.; Noireau, F.; Morin, A.; Breniere, SF. 1996. *Trypanosoma cruzi*: Study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol* 83:275-282.

Brener, Z. 1985. General Review of *Trypanosoma cruzi*. Classification and Taxonomy. *Rev Soc Bras Med Trop* 18:1-8.

Brener, Z.; Andrade, Z.; Barral-Neto, M. 2000. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2º Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 431 p.

Breniere, S.F.; Bosseno, M.F.; Telleria, J.; Carrasco, R.; Vargas, F.; Yaksic, N.; Noireau, F. 1995. Field application of Polymerase Chain Reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg* 53(2):179-84.

Breniere, S.; Bosseno, M.F.; Telleria, J.; Bastrenta, B.; Yaesik, N.; Noireau, F.; Alcazar, J.L.; Barnabé, C.; Wincker, P.; Tibayrenc, M. 1998. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* mayor clones: Transmission and circulation in young bolivian patients. *Exp Parasitol* 89:285-295.

Breniere, S.F.; Bosseno, M.F.; Noireau, F.; Vargas, F.; Yacsik, N.; Alcazar, J.; Telleria, J. 1999. La enfermedad de Chagas y sus particularidades epidemiológicas en Bolivia. En Cassab, J.A.; Noireau, F.; Guillén, G. Chagas la enfermedad en Bolivia. Conocimientos científicos actuales al inicio del Programa de Control. La Paz, Bolivia. Ministerio de Salud y Previsión Social. Pág. 217-226.

Breniere, S.F.; Bosseno, M.F.; Noireau, F.; Yacsik, N.; Liegeard, P.; Azmar, C.; Hontebeyrie, M. 2002. Integrate study of a bolivian population infected by *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(3):289-295.

Britto, C.; Cardoso, M.A.; Wincker, P.; Morel, C.M. 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast and present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 171-172.

Britto, C.; Cardoso, M.A.; Ravel, C.; Santoro, A.; Borges Pereira, J.; Coura, J.R.; Morel, C.M.; Winker, P. 1995a. *Trypanosoma cruzi*: Parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol* 81: 462-471.

Britto, C.; Cardoso, M.A.; Monteiro-Vanni, C.M.; Hasslocher-Moreno, A.; Xavier, S.S.; Oelemann, W.; Santoro, A.; Pirmez, C.; Morel, C.; Wincker, P. 1995b. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241-247.

Britto, C.; Silveria, C.; Cardoso, M.A.; Marques, P.; Luquetti, A.; Macedo, V.; Fernández, O. 2001. Parasite persistence in treated Chagasic patients revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96 (6): 823-826.

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

Busqueira, A.L.; Sembaj, A.; Aguerri, A.M.; Omelianiuk, M.; Guzmán, S.; Moreno-Barral, J.; Caerio, T.F.; Madoery, R.; Salomone, O. 2003. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart* 89: 1186-1190.

Camargo, E. 1979. Fluorescence antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved cultures forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 8: 227-234.

Canals, M.; Ehrenfeld, M.; Cattán, P.E. 2000. Situation of *Mepraia spinolai*, a wild vector for Chagas disease in Chile, in relation to others vectors from the perspective of their feeding profile. *Rev Med Chil* 128 (10):1108-12.

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

Carreño, H.; Rojas, C.; Aguilera, X.; Apt, W.; Miles, M.A.; Solari, A. 1987. Schizodeme analices of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from Chile. *Exp Parasitol* 64(2): 252-260.

Castro, C.; Macedo, V.; Prata, A. 1999. The behavior of *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic chagasics over 13 years. *Rev Soc Bras Med Trop* 32(2):157-65.

Castro, C.; Prata, A.; Macedo, V. 2005. The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 38(1):1-6.

Cerisola, J.A.; Alvarez, M.; De Rissio, A.M. 1970. Inmunodiagnóstico da doença de Chagas. Evolução serológica de pacientes com doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 12: 403-411.

Coelho, ER; of Urmenyi, TP; Franco da Silveira, J; Rondinelli, E; Silva, R; 2003 identification y PD25, a candidate universal minicircle sequence dinding protein of *Tripanosoma cruzi* INT J. Parasitol 33:853-858

Comision Nacional de Energía. Chile. 2002. La electrificación rural en Chile. Gobierno de Chile. 1992-2002. 16 p.

Contreras, M.C.; Schenone, H.; Borgoño, J.M.; Salinas, P.; Sandoval, L.; Rojas, A.; Solis, F. 1992. Chagasic infection in blood donors from hospitals in endemic regions of Chile (1982-1987). Epidemiological impact of the problem. *Bol Chil Parasitol* 47(1-2):10-15.

Correa, V. 1991. Control de vectores. Taller sobre erradicación o control de la enfermedad de Chagas en Chile. Santiago, Chile. 70 pág.

Coura, J.R. 1996. Perspectivas actuales del tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 51:69-73.

Coura, J.R. and Castro, S.L. 2002. A critical review on Chagas' disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1): 3-24.

Chiari, E. 1999. Chagas' disease diagnosis using polimerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (1): 299-300.

Chiurillo, M.A.; Crisante, G.; Rojas, A.; Peralta, A.; Dias, M.; Guevara, P.; Anez, N.; Ramírez, J.L. 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol* 10(5):775-779.

Da Silveira Pinto, A.; De Lana, M.; Britto, C.; Bastrenta, B.; Tibayrenc, M. 2002. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. *Parasitol Res* 88(12):1026-1033.

De Ornelas Toledo, M.J.; Bahia, M.T.; Carneiro, C.M.; Martins-Filho, O.A.; Tibayrenc, M.; Barnabé, C.; Tafuri, W.L.; Lana, M. 2003. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antim Agents Chem* 47: 223-230.

Dorn, P.L.; Flores, J.; Brahney, B.; Gutiérrez, A.; Rosales, R.; Rodas, A.; Monroy, C. 2001. Comparison of Polymerase Chain Reaction on fresh tissue samples and fecal drops on filter paper for detection of *Trypanosoma cruzi* in *Rhodnius prolixus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(4):503-505.

Dvorak, J.A. 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem* 24(4):357-371.

Fonseca Murta, S.M. and Romanha, A.J. 1999. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1):177-180.

Freitas, J.M.; Lages-Silva, E.; Crema, E.; Pena, S.D.; Macedo, A.M. 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 35: 411-417.

Frías, D.; Henry, A.; González, C. 1998. *Mepraia gajardoi* a new species of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) from Chile and its comparison with *Mepraia spinolai*. *Rev Chil Hist Nat* 71: 177-188.

Gibson, W.C. and Miles, M.A. 1986. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO J* 5(6):1299-1305.

Goble, F.C. 1970. South American Trypanosomiasis. In: Immunity to Parasitic Animals. Vol 2 Ed G.J. Jackson, R.; Herman y J. Singer. Appleton Century Crofts.

Gómez, M.L.; Galvao, L.M.; Macedo, A.M.; Pena, S.D.; Chiari, E. 1999. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 60(2): 205-210.

González, J.; Muñoz, S.; Ortiz, S.; Anaconda, D.; Salgado, S.; Galleguillos, M.; Neira, I.; Sagua, H.; Solari, A. 1995. Biochemical, immunological, and biological characterization of

Trypanosoma cruzi populations of the Andean north of Chile. *Exp Parasitol* 81 (1): 125-135

Guevara, A.G., Garzón, E., Bowen, C.; Cordova, X.; Gómez, E., Ouassi, E. 2005. High infection rates of *Triatoma dimidiata* are associated with low levels of *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in Pedro Carbo, Ecuador. Use of a tc24 gene-based PCR approach. *Parasite* 12: 65-68.

Junqueira, A.C.V.; Chiari, E.; Wincker, P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods, for diagnosis of Chagas disease in endemic region of North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 129-132.

Kitchin, P.; Klein, V.; England, P. 1985. Intermediates in the replication of kinetoplast DNA minicircles. *J Biol Chem* 260:3844-3851.

Krettli, A.; Cançado, J.R.; Brener, Z. 1984. Criterion of cure of human Chagas Disease after specific chemotherapy: Recent advances. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 79:157-164.

Machado, E.M.M.; Alvarenga, N.J.; Romanha, A.J.; Grisard, E.C. 2000. A simplified method for simple collection and DNA isolation for Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(6): 863-866.

Maldonado, C.; Albano, S.; Vettorazzi, L.; Salomone, O.; Zlocowski, J.C., Abiega, C.; Amuchastegui, M.; Cordoba, R.; Alvarellos, T. 2004. Using polymerase chain reaction in early diagnosis of re-activated *Trypanosoma cruzi* infection after heart transplantation. *J Heart Lung Transpl* 23: 1345-1348.

Maniatis, T. 1982. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.

Martins-Filho, O.A.; Pereira, M.E.; Carvalho, J.; Cançado, J.; Brener, Z. 1995. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor efficacy of specific treatment in human Chagas disease. *Lab Immunol* 5: 569-573.

Mideplan. 1998. Ministerio de Planificación y Cooperación. Documento 1992-1998. Encuesta CASEN. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 52 pág.

Mideplan. 2000. Ministerio de Planificación y Cooperación. Situación del Sector Rural en Chile. 2000. Documento N° 7. Gobierno de Chile. Santiago, Chile. 86 pág.

Miles, M.A.; Toye, P.J.; Oswald, S.C.; Godfrey, D.G. 1977. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *T.cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Med Hyg* 71:217-225.

Miles, M.A.; Souza, A.; Povoia, M.; Shaq, J.J.; Lainson, R. 1978. Isozyme heterogeneity of *T. Cruzi* in the first autochthonous patients with chagas disease in amazonia Brazil. *Natura* 27:819-821

Miles, M.A. 1983. The epidemiology of South American trypanosomiasis: Biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Trans R Soc Med Hyg* 77: 5-23.

Moncayo, A. 1993. Chagas disease. In: TDR Eleventh Programme Report. Geneva: World Health Organization. Pag. 67-65.

Montamat, E.; Durand, S.; Bocco, J.L.; De Luca d'Oro, G.M.; Blanco, A. 1999. Identification of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by kinetoplast DNA probes. *J Euk Microbiol* 46 (2):155-159.

Monteon-Padilla, V.; Hernández-Becerril, N.; Ballinas-Verdugo, M.A.; Aranda-Fraust, Reyes, P.A. 2001. Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch Med Res* 32(1): 39-43.

Moser, D.R.; Cook, G.A.; Ochs, D.E.; Bailey, C.P.; Mckane, M.R.; Donelson, J.E. 1989. Detection of *Trypanosoma congolense* and *Trypanosoma brucei* subspecies by DNA amplification using the Polymerase Chain Reaction. *Parasitol* 99 (1):57-66.

Moser, D.R.L.; Kirchhoff, V.; Donelson, J.E. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27: 1477-1482.

Muñoz, S.; Lorca, M.; Muñoz, P.; Solari, A. 1994. Highly homogeneous *Trypanosoma cruzi* populations in a low endemic region for Chagas disease: importance in the pathogenesis of Chagas disease in Chile. *Rev Med Chil* 122 (11):1231-1238.

Murta, S.M.F.; Gazzinelli, R.T.; Brener, Z.; Romanha, A.J. 1998. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzimidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 93: 203-214.

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

OPS, 1992. Iniciativa de los países del Cono Sur. Primera Reunión de la Comisión Intergubernamental para la Eliminación del *Triatoma infestans* y la interrupción de la transmisión de la tripanosomiasis americana por transfusión. Buenos Aires, Argentina. Doc OPS/PNSP/92.18.

OPS, 1999. Enfermedad de Chagas (triplanosomiasis americana) Normas técnicas de vigilancia de enfermedades transmisibles. Publicado por el Ministerio de Salud, División de Salud de las Personas; Departamento de Epidemiología. Capítulo 8. Pág. 45-47.

OPS/OMS. 1999. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica. OPC/HPC/HCT/140/99,32 pp. *Rev Patol Trop* 28: 247-279.

Oscherov, E.B.; Bar, M.E.; Damborsky, M.P.; Milano, A.M.; Avalos, G.; Borda, M.A. 2003. Chagas' disease epidemiology in the province of General Paz, Argentina. *Rev Saude Publica* 37(1):59-64.

Oste, C. 1998. Polymerase Chain Reaction. *BioTechniques* 6:162-167.

Pagano, M. and Gauvread, K. Fundamentos de Bioestadística 2001. Ed. International Thomson Editores S.A. de CV.

PHAO (Pan American Health Organization), 1994. Chagas disease and the nervous system. Scientific Publication N° 547.

Pinto Días, J.C. 1990. Enfermedad de Chagas. Epidemiología-Clinica-Terapéutica. Programa de Salud Humana. Buenos Aires, Argentina.

Rangel-Flores, H.; Sánchez, B.; Mendoza-Duarte, J.; Barnabe, C.; Breniere, F.S.; Ramos, C.; Espinoza, B. 2001. Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg* 65(6): 887-895.

Rassi, A. and Luquetti, A.O. 1992. Therapy of Chagas' disease. In S. Wendel, Z. Brener, E. Camargo, a. Rassi (eds), *Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine*. ISBT, Sao Paulo. Pag. 237-247.

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

Revollo, S.; Oury, B.; Laurent, J.P.; Barnabe, C.; Quesney, K.; Ribeiro dos Santos, G.; Nishiya, A.S.; Sabino, E.C.; Chamone, D.F. 1999. An improved PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. *Am Trop Med Parasitol* 93(7): 689-694.

Riou, G. and Pautrizel, R. 1969. Nuclear and kinetoplast DNA from trypanosomae. *J Protozool* 16:509-513.

Rodríguez Coura, J. and De Castro, S. 2002. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1): 3-24.

Russomando, G.; Figueredo, A.; Almiron, M.; Sakamoto, M.; Morita, K. 1992. Polymerase Chain Reaction – based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol* 30:2864-2868.

Schenone, H. 1999a. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (1): 289-294.

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

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

Schenone, H.; Rojas, A.; Alfaro, E.; Concha, L.; Aranda, R. 1981. Longitudinal study of the persistence of the therapeutic action of nifurtimox and benznidazole in patients with chronic Chagas infection. *Bol Chil Parasitol* 36(3-4): 56-62.

Schenone, H.; Christensen, H.; De Vásquez, A.; González, C.; Méndez, E.; Rojas, A.; Villarroel, F. 1985. Fuentes de alimentación de triatomas domésticos y su influencia epidemiológica en relación a enfermedad de Chagas en áreas rurales de siete regiones de Chile. *Bol Chile Parasitol* 40: 34-38.

Schenone, H.; Contreras, M. del C.; Borgoño, J.M.; Maturana, R.; Salinas, P.; Sandoval, L.; Rojas, A.; Tello, P.; Villarroel, F. 1991a. Panorama general de la epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. *Bol Chil Parasitol* 46:509-513.

Schenone, H.; Contreras, M.C.; Rojas, A. 1991b. Rendimiento del xenodiagnóstico, según el número de cajas utilizadas en 1.181 personas con infección chagásica crónica diagnosticada mediante la reacción de Hemoaglutinación Indirecta. *Bol Chil Parasitol* 46:58-61.

Schenone, H.; Contreras, M. del C.; Salinas, P.; Sandoval, L.; Rojas, A.; Villarroel, F. 1995a. Epidemiología de la enfermedad de Chagas en Chile. Frecuencia de infección humana por *Trypanosoma cruzi* por grupo de edad y por regiones. *Bol Chil Parasitol* 50:84-86.

Schenone, H.; Contreras, M. del C.; Rojas, A.; Villarroel, F. 1995b. Positividad del xenodiagnóstico según edad, en personas con serología positiva para enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 50:40-43.

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

Schenone, H.; Contreras, M. del C.; Solari, A.; García, A.; Rojas, A.; Lorca, M. 2003. Nifurtimox treatment of chronic chagasic infection in children. *Rev Med Chil* 131(9):1089-1090.

Schijman, A.G.; Vigliano, C.; Burgos, J.; Favalaro, R.; Perrone, S.; Laguens, R.; Levin, M.J. 2000. Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by Polymerase Chain Reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *Heart Lung Transpl* 19(11):1114-1117.

Segura, M.A.; Molina de Raspi, E.; Basombrio, M.A. 1994. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice, after late trypanomicidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 89: 213-216.

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

Silber, A.M.; Bua, J.; Porcel, B.M.; Segura, E.L.; Ruiz, A.M. 1977. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol* 85(3):225-232.

Simpson, L. 1972. The kinetoplast of hemoflagellates. *Int Rev Cytol* 32:139-207.

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

Solari, A.; Venegas, J.; González, E.; Vásquez, C. 1991. Detection and classification of *Trypanosoma cruzi* by DNA hybridization with nonradioactive probes. *J Protozool* 38: 559-565.

Solari, A.; Muñoz, S.; Venegas, J.; Wallace, A.; Aguilera, X.; Apt, W.; Breniere, S.F.; Tibayrenc, M. 1992. Characterization of Chilean, Bolivian and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Exp Parasitol* 75: 187-195.

Solari, A.; Contreras, M. del C.; Lorca, M.; García, A.; Salinas, P. 1998. Rendimiento del xenodiagnóstico y el PCR para evaluar el tratamiento quimioterapéutico específico de la enfermedad de Chagas en niños. *Bol Chil Parasitol* 53 (1-2):27-30.

Solari, A.; Campillay, R.; Ortiz, S.; Wallace, A. 2001a. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean Chagasic patients. *Exp Parasitol* 97: 226-233.

Solari, A.; Ortiz, S.; Soto, A.; Arancibia, C.; Campillay, R.; Contreras, M.C., Rojas, A., Schenone, H. 2001b. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with nifurtimox: a 3 years follow-up by PCR. *J Antim Chem* 48(4): 515-519.

Sosa Estani, S.; Segura, E.; Ruiz, A.M.; Velásquez, E.; Porcel, B.M.; Yampotis, C. 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 59: 526-529.

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

- Steindel, M.; Dias Neto, E.; De Menezes, C.L.; Romanha, A.J.; Simpson, A.J. 1993. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol*. 60(1):71-79.
- Sturm, N.; Degraeve, W.; Morel, C.; Simpson, L. 1989. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cell by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences use in diagnosis of Chagas Disease. *Mol Biochem Parasitol* 33:205-214.
- Tibayrenc, M.; Ward, P.; Moya, A.; Ayala, F.J. 1986. Natural populations of *T.cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:115-119
- Tibayrenc, M. and Ayala, F. 1988. Isoenzyme variability in *T.cruzi*, the agent of Chagas diseases: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 42:277-292.
- Tibayrenc, M. and Breniere, S.F. 1988. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 83 (1): 249-255.
- Tibayrenc, M.; Neubauer, K.; Barnabé, C.; Guierri, F.; Sarkesky, D.; Ayala, F.J. 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random primer DNA typing and multilocus isoenzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 1335-1339.
- Tibayrenc, M. 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85-104.
- Toledo, M.J.; Bahia, M.T.; Carneiro, C.M.; Martins-Filho, O.A.; Tibayrenc, M.; Barnabe, C.; Tarufi, W.L., de Lana, M. 2003. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes. *Antimicrob Agents Chemoter* 47: 223-230.
- Torres, J.P.; Ortiz, S.; Muñoz, S.; Solari, A. 2004. *Trypanosoma cruzi* isolates from Chile are heterogeneous and composed of mixed populations when characterized by schizodeme and Southern analyses. *Parasitology* 128: 1-8.
- Umezawa, E.; Simosen, A.M.; Corbett, C.; Shikanai-Yosuda, M. 2001. Chagas disease. *Lancet* 357: 797-799.
- Valdés, J. 1991. Organización y Presupuesto. Taller sobre erradicación o control de la enfermedad de Chagas en Chile. Santiago, Chile. 70 pág.
- Venegas, J.; Ortiz, S.; Muñoz, S.; Solari, A. 1997. Molecular karyotype and schizodeme analysis of *T.cruzi* stock from Chilean triatomines. *Parasitology* 115:41-46.
- Viotti, R.; Vigleain, C.; Ancento, H.; Segura, E. 1994. Treatment of chronic Chagas' Disease with Benznidazole: clinical and serological evolution of patients with long term follow-up. *Am Hearth J* 127: 151-162.

Voller, A. 1975. Microplate Enzyme Linked Immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet* 1: 426-428

Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, A.; Rassi, A. 1992. Chagas' Disease (American Tripanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISTB Brazil 92, Sao Paulo.

Wincker, P.; Britto, C.; Pereira, J.B.; Cardoso, M.A.; Oslemann, W.; Morel, C.M. 1994. Use of a simplified Polymerase Chain Reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 51:771-777.

Wirth, D.F.; Rogers, W.O.; Barker Dourado, H.; Suesebang, L.; Albuquerque, B. 1989. Leishmaniasis and malaria: DNA probes for diagnosis analysis. *Ann N Y Acad Sci* 569:183-192.

World Health Organization (WHO). 1991. Control of Chagas' Disease. World Health Organization. Expert Committee. 97 Pag.

World Health Organization (WHO). 2000. Chagas Disease interrupted in Chile. *TDR News*. 61:10.

Zalloum, I.; Gomes, M.L.; Kinoshita, A.T.; Toledo, M.J.; Priori, A.J.; de Araujo, S.M. 2005. *Trypanosoma cruzi*: Two genetic groups in Parana state, Southern Brazil. *Exp Parasitol* 111 (1): 55-58.

Zulantay, I.; Apt, W.; Rodríguez, J.; Venegas, J.; Sánchez, G. 1998a. Evaluación serológica del tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica con Alopurinol e Itraconazol. *Rev Med Chil* 126:265-270.

Zulantay, I.; Venegas, J.; Apt, W.; Solari, A.; Sánchez, G. 1998b. Lytic antibodies in *Trypanosoma cruzi* infected persons with low parasitemia. *Am J Trop Med* 58:775-779.

Zulantay, I.; Bozán, F.; Salas, C.; Zilleruelo, N.; Osuna, A.; Gil, L.C.; Rodríguez, J.; Apt, W. 2004a. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. *Parasitol Latinoam* 59(3-4): 93-98.

Zulantay, I.; Honores, P.; Solari, A.; Apt, W.; Ortiz, S.; Osuna, A.; Rojas, A.; López, B.; Sánchez, G. 2004b. Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diag Microbiol Inf Dis* 48(4): 253-257.

X. PUBLICACIONES GENERADAS EN ESTA TESIS

Zulantay I., Honores P., Solari A., Apt W., Ortiz S., Osuna A., Rojas A., López B., Sánchez G. (2004). Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diagnostic Microbiology & Infectious Disease* 48: 253-257.

Zulantay I., Bozán F., Salas C., Zilleruelo N., Osuna A., Gil LC., Rodríguez J., Rojas A., Egea JL, Apt W. (2004). Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. *Revista Parasitología Latinoamericana* 59(3-4): 93-98

Zulantay I, Arribada A, Honores P, Sánchez G, Solari A, Ortiz S, Osuna A, Rodríguez J., Apt, W. (2005). The electrocardiographic improvement with chronic Chagas disease treatment is independent of the persistence of *Trypanosoma cruzi*. *Revista Médica de Chile* (En prensa. Octubre 2005).

Apt W., Arribada A., Zulantay I., Solari A., Sánchez G., Mundaca K., Coronado X., Rodríguez J., Gil LC. Osuna A. (2005). Clinical and parasitological evolution of chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol after 11 years of follow-up. *Annals Tropical Medicine & Parasitol* (En Prensa. 2005)

Zulantay I., Rocha C., Solari A., Osuna A., Sánchez G., Gil LC., Mundaca K., Venegas J., Rojas A., Rodríguez J., Apt W. (2005). Sensibility and precocity of kDNA *Trypanosoma cruzi* detection by polymerase chain reaction (PCR) in dejections of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis applied in chronic chagasic patients. (Enviada a publicación. 2005).

Parasitology

Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol

Wiley InterScience. Copyright 2004 John Wiley & Sons, Inc.

Inés Zulanta*, Patricia Honoresa, Aldo Solaria, Wemer Apta, Sylvia Ortiza,

Abstract

The presence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients, with negative xenodiagnosis (XD) after 6 years following completion

of treatment with either itraconazole or allopurinol. A 330-bp DNA

fragment amplified from the hypervariable regions of *T. cruzi* kinetoplast minicircles was hybridized with total J2p-labeled

DNA as probes. PCR alone enabled the identification of *T. cruzi* nucleotide sequences in 40% of the patients treated with

itraconazole and in 60% of patients treated with allopurinol. PCR used in combination with hybridization detected parasite DNA in 60% and

33% of XD negative individuals treated with itraconazole or allopurinol, respectively. These results show that PCR and hybridization are

more sensitive than conventional parasitological techniques in diagnosing patients that have undergone chemotherapy with itraconazole or

allopurinol.

(© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.)

Keywords: Chronic Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Polymerase chain reaction (PCR); Hybridization assays; Itraconazole; Allopurinol

Introduction

PCR has been successfully used to amplify targetable regions of *T. cruzi* kinetoplast DNA, which is abundant and can be easily prepared from the parasite (1,2,3,4). Oligonucleotides targeting conserved regions of the *T. cruzi* minicircles have been designed to amplify a 330-bp DNA fragment from a variable region of the parasite minicircles (5,6,7,8). Studies with serod taken from acute and chronic chagasic individuals that did not receive antiparasitic therapy showed PCR amplification of *T. cruzi* DNA in all the samples analyzed (9,10,11,12,13,14). In addition, Jijun et al. (15) determined 59.4% of sensitivity with PCR in blood samples of serologically positive chronic chagasic individuals in comparison with 35.6% and 25.7% obtained for xenodiagnosis (XD) and hemoculture, respectively. Furthermore, PCR has been reported to provide efficient 90% detection with *T. cruzi* with seropositive results for Chagas disease (16,17,18). Recently, Alvarez et al. (19) found that 43 of 50 patients previously serodiagnosed as

chagasic were positive using nested PCR (N-PCR). These authors suggested that N-PCR may be a complementary tool to parasite detection in patients with doubtful serologic result. Evaluation of the efficacy of chronic Chagas disease treatment is hampered by the lack of reliable criteria of cure as well as the rather poor sensitivity of conventional parasitological practices such as X-D. For these reasons, PCR has become a useful tool also to detect the presence of *T. cruzi* in chronic chagasic patients undergoing chemotherapy (Kuzniarski et al.) compared PCR with xenodiagnosis in chronic chagasic patients after chemotherapy with nifurtimox or benznidazole. It was observed that PCR was negative in 65% of the patients while 83% led to xenodiagnosis negative results. It was demonstrated that *T. cruzi* could be detected by PCR in all children of an infected but untreated population and in 69% of an adult population that also remained untreated. The X-D positivity determined for the same groups was 79% and

* Corresponding author. Tel.: +56-2-678-61
E-mail address: izulan1a@macil.med.uchile

; fax: +56-2-
(L. Zúñiga)
'35-6579.

0732-8893, © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved
<k>10.1016/j.diagmicrobio.2003.10.011

Antonio Osunab, Antonio Rojas, Bernardo López, Gittith Sánchez

Departamento de Biología Celular y Molecular, Programa de Biología Celular y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile
Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain
Received 15 April 2003; accepted 7 October 2003

I. Zúñiga et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 48 (2004) 13-157

1.3. Xenodiagnosis

The X-D test was carried out simultaneously with the blood sampling for PCR using two cylindrical wooden vials (seven third-instar of *Triatoma infestans* each). After feeding, a microscopic examination of insect faeces was performed at 30, 60, or 90 days of incubation at 27°C, when the previous examination was negative. All of the microscopic fields in a 2.2 cm area were examined twice (Table 1).

Table 1
Detection of *T. cruzi* kDNA by PCR and hybridization with total kinetoplast DNA probes of ³²P-labeled parasites in peripheral blood of 52 treated chagasic patients classified according to xenodiagnosis (XD) and drug received

Group n Drug X-D PCR + Hybridization +

Post-Therapy n (%) n (%)

I 15 None Negative 6 (40) 9 (60)

II 11 3 Conazole Positive 9 (81.8) 9 (81.8)

III 15 5 Allopurinol Negative 9 (60) 8 (53)

IV 11 2 Allopurinol Positive 9 (81.8) 9 (81.8)

2.4. Polymerase chain reaction (PCR) 21%, respectively. While all patients converted to negative X-D within 3-6 months after nifurtimox therapy, PCR remained positive for a longer period of time. The present work reports the usefulness of PCR and hybridization to monitor parasite clearance in chronic chagasic patients who had completed a therapeutic course with itraconazole or allopurinol 6 years earlier and whose X-D results were negative.

2. Material and methods

1. J. Patients

A total of 52 chronic chagasic individuals (mean age, 41 years old) from a highly endemic region of Chile (Regions IV and V) were treated with itraconazole or allopurinol. All patients were classified according to X-D tests performed parallel to taking of blood samples for PCR at 6 years after treatment. As a means to increase the sensitivity of parasitemia detection, the amplified PCR products were hybridized with a universal kDNA probe (Zúñiga et al., 2003). Patients were classified according to the drug used and X-D, as shown in Table 1. Patients came from regions that are under epidemiologic surveillance by the Vector Control Program

of the Ministry of Health and the Initiative of Soud1 Cone

2.2. Chemotherapy protocol

Chagasic patients were selected from a randomized, double-blind study to evaluate the efficacy and tolerance of itraconazole (n = 26; 6 mg/kg/day in 100 mg capsules; Janssen Laboratories, Beerse, Belgium) administered as directly observed therapy (DOT) divided in two doses per day over a 120-day period, or allopurinol (n = 26; 300 mg tablets; Silesia Laboratories, Rome) at a daily dose of 8.5 mg/kg for 60 days. The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of Rome, and informed consent was obtained from each patient (n = 52).

Two milliliters of blood was mixed with the same volume of a 6 M guanidine hydrochloride/200 mM EDTA solution, boiled for 15 min, and stored at 4°C. DNA was extracted from 500 µl of the mixture using the phenol-chloroform protocol and precipitated with ethanol as described by Sambrook et al. (1989). DNA was resuspended in 50 µl of water, chromatographed in a P10 filtration microcolumn, and stored at -20°C. In parallel, an external control of PCR was performed by the Research Group of Molecular Parasitology, Institute of Biotechnology, University of Granada, Spain, using essentially the same protocol with some differences, such as the use of Proteinase K, isoamyl alcohol in the DNA extraction and different origin of primers as well as all reagents used. Reactions of PCR were carried out as described by Janda et al. (2000). Briefly, 5 µl of ten-plate DNA was amplified in a final volume of 50 µl containing 0.25 mM of each of dATP, dCTP, dGTP, and dTTP, and 200 ng of forward and reverse Taq-specific primers 121 (5'-AAATAATGTACGG(f1G)GAGATGCATGA-3') and 122 (5'-GGTfCGATfGGGGTfGGTGTAATATA-3'), 2.5 U of Taq polymerase, 5 µl of 10X Taq DNA polymerase buffer, and 6.7 mM MgCl2. Mineral Oil (80 µl) was added to the reaction mixture evaporation. The PCR condition was performed to ensure that all fragments were completely synthesized (2 cycles at 95°C for 1 min and 64°C for 2 min, 33 cycles at 94°C for 1 min and 64°C for 1 min; a final incubation at 72°C for 10 min in a thermocycler). PCR internal control for amplification of the human β-globin gene sequences was as described by Sjöström et al. (1997). Routinely, for a set of five lysates from patients to be diagnosed, one negative blood sample from a noninfected person was included. A single amplified DNA preparation originating from a confirmed chagasic patient was included as positive control, and a tube without DNA was included as a negative control. A 330-bp product represented a positive assay. PCR assays were performed in duplicate. PCR products were fractionated by electrophoresis in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide, and visualized under an ultraviolet light.

L. Zullini et al. J. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 48 (1004) 153-157 255

M 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

A

2 3 4 5 -

8 9 10 11 { 2 13 14 15 16 17 18 19

B ~, ~, ; .if~j\, *1, ~, ;

~i 1i.~1

Fig. 1. A, Electrophoretic pattern of minicircle region 330 bp in size of DNA-PCR amplified with primers 121 and 122 from different human subjects and

incubated with ethidium bromide. The DNA of A transferred to a nylon membrane, hybridized with ³²P-labeled total kDNA as a probe. Lanes 2-18 show 7 patients; with 11 positive or negative PCR-based methods; a negative control; a 100-bp ladder as a molecular size marker.

2.5. Southern blot analysis: Cruzi DNA was assessed by PCR and was also confirmed

by the hybridization test. Three of the nine remaining cases that were negative by PCR proved positive in the hybridization test. These figures mean that 40% of the samples with negative XD proved positive by PCR, and this percentage increased up to 60% when the hybridization test was applied. These results were statistically significant when compared with those obtained by XD ($p < 0.0001$). In Group I.I, composed of individuals with positive XD after treatment with itraconazole, PCR were positive in 9 of 11 cases and all 9 were confirmed by hybridization; therefore, no statistically significant differences were found when a comparison was made with the results obtained by XD. In the Group 11.I (negative XD after treatment with anopurino1), 9 of 15 cases were positive by PCR, 8 of these also being positive by hybridization. When the results by PCR and hybridization tests were compared with those results of XI, statistical significance was found ($P < 0.0001$). In the Group .IV, positive XD after treatment with allopurinol, 9 of 11 cases were positive by PCR and hybridization test, with no statistically significant differences with respect to the results of XD. In the four cases belonging to the control Group I and IV, with no detectable T. cruzi kDNA by PCR or hybridization, PCR was performed using specific primers for human β -globin gene (β), with positive results in all cases; thus, the presence of inhibitors in those samples was discarded. In 40 of 52 samples (70%) PCRs were also performed blind, without knowing the previous results in the Biotechnology Center of University of Granada Spain with 90% of agreement. The four cases of disagreement belonged to Group 1 ($n = 3$) and Group III ($n = 1$). In those cases, hybridization tests were considered the definitive criteria (3 negative and 1 positive). Amplified DNA was then transferred to a nylon membrane, denatured, and cross-linked by UV irradiation. The membranes were prehybridized in 6 X SSC and 1 mM EDTA, pH 7.4, 5x Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20 μ g/ml denatured salmon-sperm DNA at 65°C, and hybridized overnight in the same solution with the labeled probe. Washing was carried out in 0.1 X SSC. Hybridization were carried out using total kDNA from T. cruzi as a universal probe and labeled by the random priming method with (³²P)dCTP (α). The membranes were autoradiographed for from 2 to 24 h. () - All tests were performed in duplicate.

2.6. Statistics

All results were analyzed using the χ^2 statistical test, and p values < 0.05 were considered to be significant.

3. Results

T. cruzi DNA detection was considered positive when both a band of 330 pb by PCR and positive hybridization were demonstrated (), or, in a few cases, when PCR was negative and hybridization positive. These criteria were applied on the basis of the description of the higher sensitivity and specificity of hybridization test that uses radiolabeled probes instead of ethidium bromide stain (). As can be seen in , in 6 of 15 cases with negative XD after treatment with itraconazole (Group I), T.

1. Zujewski et al. / Diagn. J. Microbiol. Infect. Dis. 48 (1004) 253-257

4. Discussion biology tools are more sensitive for demonstrating parasite

persistence in chemotherapeutic evaluation.

Acknowledgments

This work was supported by DI.-SAL 03/6-2 Fondecyt 1040731. Vicerre(, 1Oriade Investigación y Desarrollo (DI) Universidad de Chile, IAEA RLA 61026 and 1ru.'tituto de Biotecnología. Universidad de Granada. España.

References

The chro~c phase of Chagas disease is characterized by subpatent parasitemia and scarce tissue parasitism (Gomes et al; 1999). In this phase, the usefulness of parasitological techniques such as XD applied as evaluation tools of chemotherapeutic efficacy is limited. since the sensitivity of the techniques depends on varying density of parasites in blood (i".n(; .cr JI- ! ; ;'i5 - .!Jiq~jei,.a(t a j. ! j);j{')o. For this reason, negative results do not necessarily indicate a lack of parasitemia or a parasitological cure after treatment. The recent use of PCR to detect T. cruzi in blood samples of chagasic patients has opened new possibilities in the diagnosis and evaluation of chemotherapeutic treatment. The present study, performed 6 years after therapy allows the detection of the presence of kDNA from T. cruzi in 40% of the patients treated with itraconazole, whose XD performed at same time of the blood sample uptake for PCR were negative. The PCR results were confirmed by hybridization tests in 88.5% and 92.20% of the patients treated with itraconazole and alk1purinol, respectively. This high concordance between both methods of T. cruzi DNA detection has also been described by other authors (t"....," ; ; i.,,' , -! '";i'). In three samples from patients treated with itraconazole. with negative PCR, it was possible to detect the 330-pb band when the universal probe was labeled with 32p (11.5%), demonstrating that hybridization is more sensitive than PCR, as has been reported elsewhere, here (i'.,,' ; , - , ..;(;)-; In one case not detected with all O-purin " c u' -u vv ql, the reverse situation occurred, since hybridization was negative although PCR was positive. This fact could be due to an inadequate transference of the amplified DNA to the nylon membrane or an insufficient quantity of DNA for hybridization. This case was considered negative by the criterion of positivity accepted in the present study. With respect to Groups II and IV, each comprised of 4 patients with positive XD after therapy. in 9 cases of each group, it was possible to detect T. cruzi kDNA. The two negative cases belonging to each group could be explained by the absence of parasites in the blood sample collected. thus suggesting that the sample volume would be an important factor to be considered in chronic patients with low levels of parasitemia. Another explanation would be the presence of PCR inhibitors. This possibility was ruled out because under the same conditions, amplification assays performed using two specific primers for human β -globin gene gave positive amplification. In this regard, (i".", '-.,) "if reported four cases whose XD were positive and PCR negative, suggesting the presence of PCR inhibitors as an explanation of this fact. On the other hand, they also described the evaluation of two cases whose PCR were negative and showed β -globin gene amplification. concluding that those results were not due to inhibition of the reaction. This situation was also described by (i".~" . _ : ;j.,). The results found in the present study show that molecular Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Sánchez, G., Vargas, S.-L., & Rodríguez, J. (2003). Regression and prevention of electrocardiographic abnormalities in chronic chagasic patients treated with itraconazole 01-

allopurinol: a 10-year follow-up study. *Ann Trop Med Parasitol* 97 (1), 23-29.

Breniere, S., Bosseno, M-F., Melleria, J., Bastrenta, B., Yaesik, N., Noireau, F., Alc8J'al, J-L., Bantabé, C., Winckel, P., & Tibayrenc, M. (1998)- Different behavior of two Trypanosoma cruzi major clones: ansmis!;io!1 a!1d circulatifin j!1 y!1ul!g 001;via!1 patie!1t!;- EX1J Para!i! (" h'9, 285-295-

Britto, C., Cardoso, M-A., Wijnker, p., & MoreJ, C- M. (1993)- A simple protocol for the physical cleavage of- Trypan"-.,,ma cruzi kinet()pla. "t DNA present i!1 blood Salnpl'es al!1d its use in polymerase chain feaction (PCR)-based d~sis of chronic Chagas ' disease- M!m In.t Osl,"QJd" Cru=88.171-172.

Britto, C., Cardoso, M. A., Ravel, C., S31'torO, A., Borges-Pereira, J., Coura, J-R., Morel, C. M., & Wincker, p- (1995)- liypano.-Olna ,, "Uzi' PM3Sited etection and strain discrimination in chronic chaj,'3Sicp atients from 110ttheastemB raz!1 using PCR amplification of kinetopiast DNA and nonrdioactive hybridization. El:p Para-,it(JI8J, 462-471.

Britto, C., Silveira, C., Cardoso, M- A., Marques, p " Luquetti, A., Macedo, V., & Fen13!des, O- (2001,- Panlj;ite pet~istence in treated cl18gasic patients revealed by x.enodiagnosis and polyn\erase chain reaction- ~/e", l,,_t O_,,"aldo Cruz 96 (6),823-826-

Gomes, M., Gall'30, L., Macedo, A., Pena, S., & Chiari, E- (1999)- Olagas'disease diagnosis: ~!Tative al!a1ys!s of parasitologic, molecuhr and seroiogic ~~ Am J Trop M"d H:,- 6011),205-210-

Junquel1-a, A. C" Chiari, E., & W!1Cker, p. (1996)- Colnparison of the polymerase chain re3Ctioo with t!10 classical parasiro!}gical metjx, <fs tQr the diagnosis of Olagas diseasec in a endemic region of ~cm BrdZil TranS ROJ' Soc Trop ,fed f{vg 90 (1), 129-132-

~1alCOng, - E" Andrade, P. D., De Albuquerque, D- M., W.alK1erleyS, ., De Almeida, E- A., Guarento, M. E., & C.osta, S, C- (2002). Use of a nested polymerase clain reaction (N-PCR) ro detect T!J""IUJ,wmQ cruzi " blood sample!; from! clu-o"ic chagasic patients and patients with doubtful semlogies- Diagl! Microbioll,!fect Di. 43 (lj, 39-43-

RUSSOlnandoG, _ Figuet-edo,G -. AlmilUn, M., Sakan\Oto,M _ , & Morita, K- (1992). Polymer45e chain reaction-based detectiW\ of Trypan()Sf)ma cruzi DNA in SelUlIn- J ain Microbi()130, 2864-2868.

Saiki, R. K., Scharf, S., Fa!OO1\3F, ., Mullis, K. B., Hom, G. T., Erlich, H- A., & Aenejhm, N- (1985)- Enzymatic amplification of /3-gk1bin gellOt1UCs equencesa nd restriction site analysis tor diagnosis of sickle cell al1'-mia. Science 130, 1350-1354.

Schenone, H- (1999)- Xenodiagnosis- Mem In..t ~~wldo CntZ 94 (l), 289-294.

Solari, A., Campillay, R., Ortiz, S., & Wallace, A- (2001a)- Idelltification of Trypan(),,ma CnL ""i genotypes circulating in chilean chagasic patj ents- El:p Parosih" 97, 226-233-

1. ZllJanta' eL al.lDiagno~tic MicrobiolOg)' and Jnfe(fiou. - Di- ea. 'fe 48 (2004) 253-257 257

Sotari, A., Ortjz, S., Sot(), A., Arancibja, C., CampilJay, R., Conjreras, M., Saljnas, p -, Rojas, A~ &ScllellOne, H. (2001 b)- Treatment of T 'Y""Ro. '10ma cruzi-!1úected childret! with lUfurl1noX; a 3 year fol1ow-up by PCR. .l AntimimJh Chemot/ter 48 (4), 515-5J9.

Solari, A., Venegas, J., González, E., & Vásquez, C. (1991)- Detectionand classificajon of T'Ypan(s)nl'a cruzi by DNA hybrjdzization W!tll !1On rndiuctjye probes. .l Profozoof 38, 559-565.

Stum, N. ~., Degraye, W., ~1orel, C., & Simpson, l. (1989). Sensitive det&:tjion 8!1d schjzoden1ec lassificajon ofTrypano_ '1Omac ruzi cells by amplification of kinetoplast minjcircle DNA sequences; use in diagnosis of Chagas disease- Mol Biochem Para...itol33, 205-214-

Wincker, P-, Britto, C-, Pereira.. J- B_, Car<tozo.. M- A_, Oelen1an, o., & M1)re), C. M. (1994). Use a simplified polymerase chain ~ procedure to detect Trypanasoma cruzi in blood samples from cl!ronic chagasic patients in a rw.al endenúe area. Anl J Tf(Jp ,Wed Hyg 5', 11J-111.

World Health Orgilnization (2000)- Chagas'disease intermJpted in Chi.le. TDRNew..61,10-

~1!~l~noam ~~~~2QQ4 FLAP

ARTÍCULO ORIGINAL.

I1'1'ÉSZ ULANTA Y*, FRANCISCA BOZAN*. C. IRLOS SAL_A.S*, N1COLÁS ZILLERUELO*
.A.r|TONIO OSUNA**, LUIS C. GIL***. JORGE RODRÍGUEZ****. ANTONIO ROJAS*,
JOSE I. EGEA* y WERNERAPT*

CHRONIC CHAGAS DISEASE. ABSENCE OF mTRADQI,..1ICII..IARY Triatoma i1ifestan8
AND PERSISTENCE OF CJRCIJLATING POST- THER;\Py Irypanosoma cf"Uji

Jn 1999 Chile declare no vectorial tran.fmi3.fion of Cjtagag di3ea,\e. On the other hand. the
development of d}velling policy ~t,hich inclj. jd(:(e j"lde71¿riuc ral z(me3, have obtained impo,'1ant ad.,a11Ce3
in human ~roup3 w'lth jleight deficiejlc.y ofjzabitability. 71lis epi.demiological3ilUati011)\a3 8tudied 10
years after rhera.vy, in ~7 chruruc chagasic patients from l"llral zone.\, of the "'7 Region7 b.y an
epi~ienuologicinque8t ipre aridpo8t-ther(:tpy)atlCI parll.)irológica.l e.,.olution (post therapy). The inqueEt
inchtded: Ja'1.o.vledgeo f the vectol'; pl'esence of triat07/Uni::3i n the dK'elliqlg antecedentj of Izavl': been
bitten by triatomini?3, and con.ftnlction material8 olthe dwelling.f. The para8itological et'OhltiQrj wa.~
perfoimjed b.y xen(diagnoEiE ("D) (37 casesj alzd Pojimerafe Chain Reactjon (PCR) in peripjLerica;
blood (:;:'4c a.'es) . The '.e,\Ult3o f the epidemiological.fUj1'ey evidenced impo11ant <-.jzangeEof the
q1.talit.y

of t-he rj.f1'a; dwelling 01 the treated chclga.~ic patie1Ú8, while, ij1 relation to para8itemia. circlltant
Trypanosoma cruzi ~.a.f detected in the 89.2% l?f the caaes. (.i7.8%) and 88.2% by' .J.:D and PCR
re.f,t)ective/.i).I t i., (.o1lclluded tjjat the per.yistence of the para.~ite after thel-apy is not relatimlated with
the presence of intl"Gdomicili42ry Triatoma inJcstans.

Kcy words: Trypanosoma cnt;:i, Triatoma inj'estans. Enfe17nedad de Cfjaga;:;

INTRODUCCIÓN hiperendémicas j .Entre otras consider3Ci one.<;L. Ul

promedio gene1"31d e intección humana del 12 %

seg11J xenodiaguóstico y del 19tt(j según

serología: con aproximadamente 63.000

viviendas rurales o peri-urbanas su_ietas a

actividades anti-Triatoma infestan8~. fundamentó

la inclusión de nuestro país en el Prog1"ama

En Chile, el área enderro-enzo6tjca de la

enfermedad de Chag&c; se distribuye en sectores

rurales y peritU.hanos de las sei~ plimera.o; regiones

polftico-adminislrativas, más la Región Metro1itana,

si endo las l'egiones m y lv" consíder:adas

* La.~8.torio de PtIT~tología Básico-Clirrico. Progj'ama de Bio1ogía Cehütrr y Molf:c\J1ar. Instituto de Cienci8:"

Bjomédic~. Facultadde Medicina.IJlivelSjdadde Chile. .\

** IliStituto de BioreC\jología. F8:ultad dt:jC ierK:ias. UTÍlvelS.idal.di e Granada. EspafuL

*** HI."8pita! Clínic<.) de la Urlversidad de Chile.

**~:* ESC1.1ed1ea &. t111d. Piiblica. Facultiid de Me(licinfi. Universid8il de Chile .

93

ll:ife,-,?:!Jeqa41~9hf¿-Ka~ S!!!!iE(i Pe~~deT~nQs(nla {;:ruzi.jX)-!!~~rapia ~a.~~al

Intergubernamental del Cono Sur para la

EliminacióD de Ir-I Transmisión Vectorial y

Transfusional de la Enferme(lad de Chagas4, Tras

la aplicación de esta iniciativa, se certificó a Chile

como el segundo p3ís que ha intemlpido la

transmi\$ión vecrorial de la enfermedad de

C:Mgas5.

Paralelo a estos importantes avances, la

Reacción en Cadena de la Pohmerasa (PCR) se

ha constituido en una promisoría helTamienta de

diagtlóstico, ampli ficando _L\DN de T1'jpanosorra

cruzi desde regiones altamente repetidas del

genoma del parásito", demostrando alta ~ensibiJOidtr1od

7a spectso ampliamente abordado por

diferentes grupos de investigación, ha sido la

quimioterapia de la enfermedad de Chagas Cr6niCB,

etapa para la cual, se ha sugerido investigar

medjcamientos djseñados para afeccione.~ no

relaci onadas que exhibrol actividad contra 7: cl~zi

y Se&l inocuos para el hombre\J.11.

En el pre..qentee studio, se asocia la condición

parasitológica deteliminada por ¿m y PCR con

algunos antecedentes epidemiológicos relacionados con el hábitat intradoméstico de las jirafas en chagásicos crónicos tratados.

MATERIAL y MÉTODOS

Las jirafas, se les consultó en forma anexa, si realizaron denuncia a la autoridad sanitaria con el correspondiente y la fecha aproximada de presencia del vector en el domicilio. Se aplicó, en condiciones de post-terapia (2002), dos cajas de xenodiagnóstico (XD), según técnica descrita previamente. Cada una de ellas contenía siete ninfas de tercer estadio de *T. cruzi* libres de infección. Las cajas fueron mantenidas a 27° C, realizando posterior examen microscópico de la muestra fecal de los insectos a los 30, 60 y 90 días de incubación, en búsqueda de formas tripomastigotas. (le 7: c11.tz1).

A cada paciente en condiciones de post-terapia, se le extrajo 10 cc de sangre venosa, distribuidos de la siguiente manera: 5 ml para PCR, recibidos en buffer Guanidina HCl 6M y EDTA 0,2M usados como preservante y anticoagulante respectivamente, y 5 ml en tubo sin anticoagulante para la obtención de suero y posterior análisis por serología convencional. Las muestras fueron alícuotadas y mantelidas a -20°C hasta su uso.

Se determinaron los niveles de anticuerpos IgG contra antígenos totales de *T. cruzi* mediante las técnicas de inmunofluorescencia indirecta (IB) y EUSA. Se consideró una reacción de IFI positiva cuando el título fue igual o mayor a 160. Para EUSA, el límite diagnóstico de positividad se calculó como el producto de la media aritmética de los controles negativos más tres desviaciones estándar.

Con el fin de extraer el ADN genómico (k.A.D.11), se utilizó el protocolo de Zip, para realizar PCR. Las muestras fueron precipitadas y lavadas con etanol absoluto y etanol 70%, respectivamente, seguida del proceso de digestión con TRIS (0,01M), EDTA (0,005M), SDS (0,5%) y proteinasa K (20 mg/ml). Las muestras fueron sometidas a un proceso de desproteinización con fenol-cloroformo-alcohol isosmílico seguido de un proceso de precipitación del ADN con acetato de amonio 3M y etanol absoluto. Una vez finalizada esta etapa, el ADN fue purificado en columnas de Sephadex 0-25 y utilizado como molde para la reacción de PCR. La mezcla de reacción está compuesta por 5 µl de la mezcla de reacción, 3 µl de los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTAC~ (TICfj GAGATGCATG~) y 122 (5'-GGTrCGATTC1GOOTTCTGTAT..TATA1'), a una concentración de 25 µM, 5 µl de buffer de Taq polimerasa (que contiene Tris-HCl pH 8,867 mM, 16,6 mM de (NH₄)₂SO₄ 4' 6,7 mM de MgCl₂).

Se evaluaron 37 pacientes chagásicos crónicos procedentes de zonas rurales de la IV Región. 17 hombres y 22 mujeres (promedio de edad 43 años); tratados con itraconazol (n = 11) o itraconazol (n = 26) en el año 1992, según protocolo descrito. Los casos se seleccionaron de acuerdo a los siguientes criterios: haber sido encuestados antes y diez años después de concluida la terapia, que contaran con muestras de sangre periférica para PCR y se les hubiera aplicado XD en condiciones de post-terapia. Finalmente, que su procedencia correspondiera a localidades rurales de zonas endémicas incorporadas a

programa de control del vector.

La encuesta epidemiológica aplicada en 108 años 1992 (previo a la terapia) y 2012 (después de post-terapia) incluyó información acerca de: conocimiento del vector, presencia de triatominos en el domicilio actual, antecedentes de haber sido picado por triatominos y, en relación a la infraestructura de la vivienda, material de muros y techo. A todos aquellos pacientes que declararon en el año 1992 infestación domiciliar por triatominos.

Q4. Efectividad de la intervención de control del vector. Trypanosomiasis americana; leishmaniasis.

RESULTADOS

En el año 1992, como se observa en la Tabla 1, el 18,2% de los encuestados manifestó conocer a los triatominos, el 18,9% afirmó presencia de triatominos en el domicilio actual y el 18,8% tenía la seguridad de haber sido picado por ellos. En relación a la vivienda, el 48,6% de los muros de la vivienda habitada por el paciente eran de adobe, el 13,5% de cemento o adobe estucado y el 29,7% de madera. En relación al material del techo de la vivienda, el 59,5% era de zinc, el 12,7% de zinc-refino y el 10,8% de quincha (paja y barro). En la encuesta aplicada a los mismos pacientes en el año 2002, se mantuvo el porcentaje en relación al conocimiento del vector (89,2%), ninguno de los casos reportó presencia de triatominos domiciliario o peri-domiciliario (p = 0,0086) y el 81,8% manifestó haber sido picado por las chinches. Con respecto al material de los muros de las habitaciones en el año 2002, sólo el 18,1% era de adobe (p = 0,0086), el 48,6% de madera (p = 0,0086) y el 32,4% de cemento o adobe estucado (p = 0,0086). Para el mismo año se aplicó el método de inmunodifusión por difusión en gel de agarose (1% de agarose, 0,5% de SDS y 0,05% de EDTA) y los cuatro grupos de triatominos (T. dimorfo, T. brevipalpis, T. sanguinolenta, T. phyllotis), 31 de los 81 pacientes bidentados en un volumen final de 50 µl más de 4 l. T. Taq polimerasa (0,5 µl). Esta mezcla fue incubada por 80 segundos y aceite mineral. El programa de amplificación de la reacción de PCR consistió en: dos ciclos iniciales de 98°C por 1 minuto y 64°C por 2 minutos; 33 ciclos intermedios de 94°C por 1 minuto y 64°C por 1 minuto y un ciclo final de 72°C por 10 minutos. Finalmente, los productos de la amplificación se analizaron en un gel de buffer de carga que contenía bromofenol azul de bromofenol y se sometieron a electroforesis en gel de agarose 2% en buffer Tris Borato EDTA 1x. El gel fue teñido con bromuro de etidio (5 µg/ml) por 10 minutos y luego fotografiado. Se consideró como una reacción positiva para PCR la aparición de una banda de 330 pb correspondiente a la amplicón de 1: cruzp6-1.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS. La prueba utilizada para evaluar los cambios fue McNemar y Fisher para comparar las frecuencias de triatominos. El nivel máximo de significación se estableció en 0,05.

Tabla 1. Antecedentes epidemiológicos de triatominos procedentes de zonas rurales de la IV Región tratados con alopurinol y itraconazol en las intervenciones de pre-terapia (año 1992) y diez años después de concluida la terapia (año 2002)

1992 2002

n % n (ic): ValorP

33

4

89,2 p > 0,05

10,8

33

4

89,2

10,8

7

30

18,9

81,1

0

37

0,0

100,0

P = 0.0086

81,8

18,2

31

6

p :-0,05

83,8

16,2

30

7

18

5

48,6

13,5

2,7

29,7

5,4

3

12

8,1

32,4

2,7

48,6

8,1

P = 0,00001

P = 0,0086

P :-0,05

P = 0,0086

P > 0,05

13

3

11

2

Conoce las vinchuc38

~

No

Ex-isten en el domicilio actual

~

No

Ha9do pirndo por ,inchucas

8

No

Paredes habitaciones de la vivienda

Adobe

Cenlenrüol 1dobee st\JCadoCOJlcemento

LOOriJlo

Made111

Volcan1ta

TecOO de la "i..ien(hi

7jnc

Piz81Tefio

Q~h8

Madem

22

IO

4

1

59,5

27,0
10,8
2,7
25
12
0
0
67,6
32,4
0,0
0,0

P > 0,05
P > 0,05
P > 0,05
P > 0,05

95

~

período, no se reportaron techos de quijcha (p > 0,05).

En la Tabla 2. se observan los resultados de la evaluación parasitológica realizada en los mismos pacientes encuestados, diez días después de concluida la terapia con allopurinol o itraconazol. Se detectó la presencia de T. cruzi en 33 de los 37 casos; los mismos fueron positivos (89,2%) al Utilizar BrX D, ~R o ambas técnicas en fonda simultánea. Las sensibilidades obtenidas para los dos métodos fueron de 137,8% (14/37) y 88,2% (19/34) para XD y PCR respectivamente.

Tabla 2. Resultados de XD y PCR obtenidos en 37 chagásicos (rómicos) residentes de zonas rurales de la IV Región tratados con itraconazol o allopurinol en seguimiento prologado (diez años post-terapia):

N XD PCR %

11
19
4
3

29,7

51,4

10,8

8,1

+ ++

+ ND

* P > 0,05

DISCUSIÓN

El Programa Nacional del Control del Vector de la enfermedad de Chagas en Chile, impulsado por el Ministerio de Salud, se inicia en el Servicio de Salud Coquimbo en el año 1980, permitiendo mantener bajo control la presencia de triatominos en el 70% de las viviendas de áreas endémicas, con una reinfestación promedio del 3,4%. El Programa Interregional del Cono Sur para la Eliminación de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas, colaboró tales esfuerzos. El presente estudio, realizado en zonas rurales de la IV Región de nuestro país, evidencia que un importante porcentaje de pacientes en los cuales se ha comprobado la infección por T. cruzi, no declara haber sido picado por ellos. Todos aquellos casos, que en la encuesta aplicada en 1992 declararon infestación domiciliar por triatominos, fueron estimulados a realizar la denuncia correspondiente para

concretar la implementación del Programa sobre el Ambiente. Tras este hecho, la totalidad de los afectados, informa que se realizaron actividades de investigación triatomínica, ataque y vigilancia, logrando identificar al insecto en sus domicilios y peridomicilios en un período no inferior a dos años. Es así como, en el año 2002, tal como se observa en la Tabla 1, el 100% de los casos reporta ausencia de triatominos en sus viviendas. Con respecto a la información entregada por los encuestados en relación a la picadura de triatominos, es posible que el 16,2% que manifiesta haber tenido contacto con el vector, y aún así, estar infectados por *T. cruzi*, se deba a: transmisión transplacentaria y transmisión vectorial que no fue percibida por el infectado (edad, hábitos nocturnos del triatomo, picadura indolora, ausencia de lesiones, "Utánea", etc.). Por otra parte, es interesante observar los cambios que durante la década 1992- 2002, tuvo el material de construcción de muros y techos de las viviendas de los pacientes encuestados. En el año 1992, un 48,6% de los casos vivía en casas de adobe. Por el contrario, en el año 2002, un 32,4% posee viviendas con paredes de cemento o adobe pintado y un 48,6% paredes de madera. Tal situación se ha visto favorecida por políticas habitacionales desarrolladas para el área rural de nuestro país, que han permitido importantes avances en grupos humanos que presentaban graves deficiencias de habitabilidad (materialidad o mantenimiento)²⁰. El otorgamiento de subsidios municipales permitió que dicho déficit disminuyera al 9,9% en el año 1998, en comparación con el 16,7% informado para el año 1990. Junto a ello, la cobertura de viviendas rurales electrificadas en la IV Región ascendió de un 54% a un 79% entre los años 1992 y 2002.

Después de diez años post-terapia (año 2002) todos los pacientes mantienen la serología convencional positiva (IFA y RUSA) y en el 89,2% de los casos se evidencia mediante XD o PCR o ambos, la persistencia de *T. cruzi* circulante. La mayor sensibilidad de PCR en comparación con XD obtenida en el presente estudio, ya ha sido previamente reportada²³, validando su uso como herramienta de evaluación de eficacia quimioterapéutica¹⁷; S.A. Al correlacionar los resultados epidemiológicos y parasitológicos, diez años después de concluida la terapia, es posible sostener, que la persistencia de la parasitemia no está directamente relacionada con la exposición a *T. cruzi* intradomiciliario, puesto que en comparación con el año 1992, las condiciones favorables para su desarrollo por

1. Fernández C. et al. T...w. ~ ~ fennaaa de haga." cr(mtca l-r .il.\tmtCIL-,!!:A',!e!OSOMtt cruzi po,~t,t.erapta . -l, Z~Unl~t al erl al.ile. Gobierno de Chile. 1992-2002. J.6 páginas.
 23.- COURA J R, CASTRO S L. t, l~jtíCal R~\.'flew Qtl Cl1agas'dise3Se Chemoth('lapy. Mem. Inst Oswa1do C..''ruRz.i o d(' Janrno 1002: 97(J.): 3-24.
 24.- BRITTO C, SILVEIRA C, CARDOSO M ~ eiaJ. P1ff3Sjtt pcrsi,;tellice in i.re:ated ch.1.gasic patients

lev: a1ed 1: IY xe1lodiagnosis and pO)'111erese ch3irl
 reaction. Mem Inst a:., \ra1doC n1Z 2.001; 96: g23-26.
 25.- DE ORNELP-C; TOLEDO M J, BAHIA M T .
 CARNEIRO CM et al. Chtnlohelapy wit11
 betlznidazole and jtraconazol: for Inice infect~d with
 diffelet Trvpana3ama l'ruzi clona1 g(!n.otypes
 .4nt.imicrobia1 Agents and Chernotherapy 2003; 47:
 223-30.
 .4.grltil't'lnienIOS: Esie estudio fue final1Ciado po:!. el
 Proyt:cto DI-SAL ()9iO3, Universidad de Chile y el irlStitl1to
 de Biotecnoioía. Facultad de Cie.ncias. IIM'trsidad dl:
 C1C3ruidEa.s paña.
 JTrop Med Hyg 1994; 51 771-7.
 17.- SOL.L\RI A, ORTIZS. SOTO .\` et al Tlealntent of
 Tryponosomat :1U7.Jin fectedchi1dren. withnifurrimox'
 a 3 year.fonow-up by PCR. J A.ntimíClob Chernother
 2())1; 515-19
 18.-Zljuv-. TAYL HONORE..';:tP, SOLARIAeta1 Use
 of po1ynlerase chain reacii0/l (PCR) 3lld 1~~ridízati<m
 assa]"Sto dtt(" .ct1 'rypaltoso1l'at :rlzi inchrórúc chagasi('
 p.liiml'; treaid ~Íth itraconazole or allopurínol Diag
 Microbiol1rj Dis 2(x.144; 8: 253-7.
 19.- VALDES J M. Organizaci6n yPresurxlestOT. aller sobre
 erradjcaci(il o con1rol de la enfmnedad de Chagas en
 Chi1e. Santiago, Chile, 1991. 70pág.
 20.- MIDEPUN. MiJri.c;terio d(. Planifjca6n y Cooperaci6n.
 1998. DocUInento 1992.1998. Enl.'Uf.5ta
 CASEN.
 21.. ~1IDBPLAN. Ministerio de Pl;mificaci6n y Cooperaci6n
 Siwaci6n del Sect11 Rura1 en Chile 2000,
 Doc1ffirmito l'ro 7, Gobierno de Chile.. 86 pág.
 22. COIn1si6nN iv:i<mad1e Energia. La electrificaci6nruraJ
 :xvn Congreso Latinoamericano de Parasitología
 IV Congreso Argentino de Parasitología
 XXIX Jornadas Internacionales de Hidatidología
 La p arasitología y su contribuci6n a una América Latina unida
 9 a112 de noviembre, 2005- Hotel Costa Galana
 Mar del Plata, BuenosAires, Argentina
 Mesas redondas
 Hidatidosis
 Epidemiología de parasitos intestinales
 Antiparasitos en medicina veterinaria
 Parasitosis y Silla
 Toxoplamosis
 Paleoparasitología
 1via1aria
 LcimmanDsis
 Parasitosis de organismos acuáticos
 Zoonosis parasitarias
 Fecha límite de presentaci6n de resúmenes: 15n 12005
 98

ANNALS OF TROPICAL MEDICINE
AND PARASITOLOGY

Dr W Apt
Laboratorio de Parasitologia Basico-Clinico
Programa de Biologia Celular y Molecular
Instituto de Ciencias Biomedicas
Facultad de Medicina, Universidad de Chile
Independencia 1027
Santiago

Our Ref: 05/28

20 June 2005

Dear Dr Apt

Clinical and parasitological evolution in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol after 11 years of follow up

W. Apt, A. Arribada, I. Zulantay, A. Solari, G. Sanchez, K. Mundaca, X. Coronado, J. Rodriguez, L.C. Gil, A. Osuna

The above manuscript has now been provisionally accepted for publication in the Annals of Tropical Medicine and Parasitology. Before it can be edited, however, certain amendments need to be made, and I enclose a sheet of comments from the referees. If you are willing to amend your manuscript, re-writing the text where necessary, I will edit the revision. If I do not hear from you within the next 6 months, however, I will assume that you no longer wish the Editorial Board to consider your manuscript for publication, and will therefore dispose of the original version.

Best wishes

Yours sincerely

Keith

Keith Wallbanks

With apologies for the slow response
Keith

LIVERPOOL SCHOOL
OF TROPICAL
MEDICINE



Editor: **Dr Keith Wallbanks**

Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool L3 5QA, U.K.
Telephone: +44 (0)151 705 3131 Fax: +44 (0)151 707 9115 E-mail: krw@liverpool.ac.uk

Published by Maney Publishing for the Liverpool School of Tropical Medicine

<http://www.maney.co.uk/atmp.html>



MANEY
publishing

Clinical and parasitological evolution in chronic chagasic patients treated with itraconazole and allopurinol after 11 years of follow up

W. APT^{*}, A. ARRIBADA[†], I. ZULANTAY^{*}, A. SOLARI[§], G. SÁNCHEZ[§],

C. MUNDACA^{*}, X. CORONADO[§], J. RODRÍGUEZ^ᵇ, L.C. GIL[‡], A. OSUNA^ᶜ

Autor Correspondence

Dr. Werner Apt Baruch. 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. Phone: 56-2-6786122 Fax: 56-2-7356579 P.O. Box 427-Santiago 3. Chile. E-mail: wapt@med.uchile.cl

1

* Laboratorio de Parasitología Básico-Clínico. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, P.O.Box 427, Santiago 3, Chile

† Departamento de Medicina, Hospital San Borja Arriarán, Universidad de Chile, P.O.Box 9183, Santiago 1, Chile, and Servicio Cardiología, Clínica INDISA, P.O.9183, Santiago 1, Chile.

§ Laboratorio Biología Molecular de Parásitos. Programa de Biología Celular y Molecular, Instituto de Ciencias Biomédicas Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, P.O. Box 70086, Santiago 7, Chile

Ⓐ Escuela de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Independencia 1027, P.O. Box 427, Santiago 3, Chile.

‡ Servicio de Gastroenterología, Hospital Clínico, Universidad de Chile, Santos Dumontt, P.O.5 , Santiago 7, Chile.

Ⓒ Departamento de Parasitología, Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Campus de Fuentenueva, Avenida Severo Ochoa s/n, E-18071, Granada, España.

ABSTRACT

A 11 years effect of itraconazole (ITRA) and allopurinol (ALLO) in the control of parasitemia and correction or development of electrocardiographic abnormalities in 109 chronic chagasic patients is evaluated. In relation to the ECG, there are four groups: 1) 51 patients in the indeterminate period with normal ECG pre and post-therapy (N/N). 40 (78.4%) of them had positive parasitological tests: xenodiagnosis (XD) or polymerase chain reaction in blood (PCRB) and in feces of *Triatoma infestans* applied to the same patients (PCRFB) or universal probe in blood (HYB) or in feces of triatomines (HYF). 2) 16 chagasic cardiopaths who normalized the ECG (C/N). 14 (87,5%) had positive parasitological tests. 3) 24 patients with initial normal ECG, who 6-12 months later presented ECG alterations (N/C). 17 (70.8%) had positive parasitological tests 4) 18 chagasic cardiopaths who maintained so during the 11 year of follow up (C/C). 17 (94.4%) had positive parasitological tests. HYB and HYF had a greater positive percentage that obtained with PCRB and PCRFB ($p < 0.05$). The results obtained with PCRFB and XD were not statistically different ($p > 0.05$) but both had less positivity results that obtained with HYB and HYF ($p < 0.05$). In 21 cases (19.3%) no parasites could be founded, 13 (62.0%) of them had a normal ECG, 7 of these received ITRA and 6 ALLO. This cases are "cured", nevertheless all of them had positive conventional serology. ITRA has less side effects then ALLO, and has action on the parasite, for this reasons we believe that ITRA is the drug of choice to treat chronic Chagas disease in adults.

INTRODUCTION

According to the World Health Organization there are 16 to 18 million individuals infected with *Trypanosoma cruzi* in Latin America (De Souza, 2002). More than half of these are in the Southern Cone countries (Argentina, Brazil, Bolivia, Chile, Paraguay and Uruguay) where a major program is currently underway to halt transmission through large scale vector control and screening of blood donors. Thanks to this program Uruguay in 1997 and Chile in 1999 declare no vectorial transmission by *Triatoma infestans* (the main vector of Chagas disease in these countries) (WHO,2000). Argentina and Brazil are very close to achieve the interruption of vector transmission. In Brazil only 2 of 12 endemic states still have vectorial transmission (WHO,2002). Previous investigations carried out by us in Chile indicate that there are approximately 150.000 infected individuals. About 30% of them have some degree of cardiopathy and one in every three of those with *T. cruzi* cardiopathy will probably require a pacemaker to survive (Arribada et al.,1986; Prata,2000). There is now a consensus that all those who are infected with *T.cruzi* should be treated unless they have reached the late, chronic phase of the infection (Pinto Dias,2003; Urbina & Docampo, 2003) In spite of recent advances there is no drug that provides satisfactory treatment of chronic *T.cruzi* infections. There are many drugs with activity against *T.cruzi*, but the only ones that can currently be given to humans on the basis of ethical and clinical considerations are nifurtimox (Lampit ®, Bayer chemicals, Leverkusen,

Germany) and benznidazole (Ragonil®, Roche, Basel Switzerland). Nifurtimox and benznidazole are used successfully in the treatment of acute infections and complete clinical, parasitological and serologic rates are achieved 60-80% of the cases (Cerisola, 1969; Cançado, 1999; Rodríguez Coura & De Castro, 2002). In chronic cases, especially in children with recent chronic infection, high indexes of success has been obtained with both drugs (Andrade et al., 1996; Sosa Stani et al., 1998). Nifurtimox and benznidazole have important side effects in adults, and are available on a limited basis, which limited their use (Coura et al, 2002). For these reasons it is important to have access to an efficient, safe, low cost drug. ALLO has been used in different lengths of time in various dosage to treat acute and chronic Chagas disease, with different results (Gallerano et al., 1990; Tomomori-Yamashita et al., 1997). ITRA, a synthetic imidazole derivative, has shown good efficacy in vivo and in vitro experiments, resulting in total cure in chronically infected mice (McCabe et al., 1986; Marr, 1990). This drug has been used in human for the last 25 years as an efficient antimicrobial without any severe side effect. For these reasons we decide to evaluate the long term effect of ITRA or ALLO in the control of the parasitemia and the correction or development of electrocardiographic abnormalities in chronic chagasic patients.

SUBJECTS AND METHODS

Patients

A total of 109 chronic chagasic patients from endemic regions of Chile were selected from the initial group that participated in a double-blind study to evaluate the efficacy of ITRA and ALLO (Apt et al., 1998). Of them 54 were treated with ITRA and 55 with ALLO. After eleven years of follow up a complete parasitological study by xenodiagnosis (XD), PCR in blood of the patients (PCRB) and in faeces of *Triatoma infestans* applied to the some patients (PCRF), and hybridization assays with universal probes (HYB) were performed. Patients were classified according to positive or negative results of the parasitological tests (XD, PCRB, PCRF, HYB).

Therapy

ITRA (Laboratory Janssen, Belgium) was given as a single daily dose of 6 mg/Kg for 120 days. ALLO (Laboratory Silesia and Laboratory Saval) was given as a single daily dose of 8.5 mg/kg for 60 days. The drugs were administered as directly observed therapy (DOT). The study was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medicine of the University of Chile, and informed consent was given by each patient who participates in the study (Apt et al., 1998).

6

Electrocardiographic evaluation

A 12 derivation electrocardiographic study were performed to all patients, following the double-blind protocol redommended by the World Health Organization (Arribada et al.,1986). Under this protocol the investigator analyzing the electrocardiogram traces (ECG) remains unaware of the patients xenodiagnosis, PCRB, PCRF, HYB and HYF results, or subsequent treatment status. ECG was performed before treatment, every four months during the first year and once a year in the last 10 years of follow up.

Xenodiagnosis

Was performed by technique described by Schenone et al., (1974). Each box used had 7 ninphs of third to four instar of *T. infestans* free of infection. After application the boxes were maintained at 27°. One examination of the feces of each insect was performed with a pool of 30, 60 and 90 days of incubation, searching for trypomastigotes forms of *T.cruzi*.

Triatomine deyections

Where obtained from a pool of triatomine deyections fed with peripheral blood of the patients studied by XD application and received in Diamond Media. The material was incubated at 98°C per 15 min and centrifugated at 4000 rpm during 3 min. Finally, the obtained supernatant was frozen until its use.

DNA extractions

Two ml of blood was mixed with the same volume of 6M guanidine hydrochloride/ 0.2M EDTA solution, boiled for 15 min, and stored at 4°C. DNA was extracted from 500 µl of the mixture using the phenol-chloroform protocol and precipitated with ethanol as described by Wincker et al. (1994). DNA was resuspended in 50 µl of water, chromatographed in a P10 filtration microcolumn and stored at -20°C until use.

PCR

Triplicate assays were performed in the venous blood of the chagasic patients as the deyections of triatomines of the xenodiagnosis studies, by the protocol described by Solari et al., (2001). One part of the extracted blood was stored in guanidine EDTA buffer (2 ml) than boil during 15 minutes and stored at 4°C. Afterwards was alicuoted in 800 µl volumens in duplicate for the extraction of DNA. Each sample was precipitated in a solution of absolute ethanol (1 ml) and washed with 70% ethanol (1 ml). Then the blood pellet was submitted to a digestion process in 500 µl of digestion Buffer (Tris 0.01 M, EDTA 0.005 M, SDS 0.5%) and proteinase K (20 mg/ml) and incubated all night at 40°C. Afterwards each sample was submitted to a desproteinization process in a phenol solution (250 ml) clorophorm-iso amilic alcohol (250 µl) in a proportion 1.1 (v/v), followed by a centrifugation at 12000 rpm during 15 minutes at 4°C, recovering the supernatant, and repeating this procedure twice. The recovered supernatant was mixed in a clorophorm solution-isoamilic alcohol (500 µl) and was centrifugated in the same

condition. The final supernatant was mixed with 1/10 volume of ammonium acetate 3 M and 2 volumes of cold absolute ethanol, leaving all night at -20°C for the precipitation of the DNA. A pellet was obtained from the precipitation, which was centrifugated in the described conditions and washed with 70% ethanol. Once the process was finished the pellet was dried at 4°C , resuspended in 50 μl sterile distilled water and then purified with Sephadex G-25 columns, and used as matrix for the PCR reaction.

Electrophoretic analysis of PCR products

PCR products were fractionated by electrophoresis in 2% agarose gels, stained with ethidium bromide and visualized under an ultraviolet light. Amplified DNA was then transferred to a nylon membrane, denatured and cross-linked by UV irradiation. The membranes were prehybridized in 6 x SSC and 1 mM EDTA, pH 7.4, 5 x Denhardt's solution, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS), 20 $\mu\text{g/ml}$ denatured salmon-sperm DNA at 65°C and hybridized overnight in the same solution with the labeled probe. Washing was carried out in 0.1x SSC. Hybridization was performed using total kDNA from *T. cruzi* labeled with ^{32}P . The membranes were autoradiographed for 2 to 24 h (Solari et al., 2001). All tests were performed in duplicate.

Hybridization with universal radioactive probe

It was performed according to the protocol described by Solari et al. (2001). The membranes with the transferred DNA, were hybridized with universal radioactive

9

probes. The membrane was prehybridized with 20 ml of a prehybridized solution (SSC5 x blocker reactive 0.5% p/v lauril sarcocinate of sodium 0.1% SDS 0.002% p/v) in hybridization flasks at 68°C per 2 hours, in hybridization chamber. Then part of the prehybridized solution was discharged, leaving 5 ml of this in the flask, to which the desaturated probe of kDNA marked with P^{32} was added. The membranes were incubated all night at 68°C in a rotatory hybridization oven. Afterwards the samples were washed twice during 30 minute at 68°C, in the same flasks were had been hybridized, with 100 ml of hybridization solution SSC 0.1 x SDS 0.1%. Finally the membranes were plastified and exposed to autoradiography films or plaques exposition in the Personal Molecular Phospo Image for variable periods, depending of the detected radioactivity when the hybridization process has concluded.

Detection of the hybridization signal

After the exposition of the hybridization membranes with universal probe, the radiographic film were revealed in a dark chamber sumerging them in a reveals solution per 5 minutes, continued with a washing with destilate water and finally submerged in a fixation solution for 5 minutes, drying at room temperature. The membranes exposed in plates in the Personal Molecular Imager FX BIO-RAD, were scanned by the Personal Programm FX to detect the marking signal. For both systems of detection of the signal of hybridization, were considered positive the hybridization signals with intensity on the background of the film or radiographic plate.

10

Positivity criteria

We considered as positive status, if one or more of the parasitological tests was positive.

Statistic analyses

The XD, PCR_B, PCR_F and hybridization results were analysed by difference of proportions, and chi square.

RESULTS

In relation to the results of the electrocardiographic tracings there are 4 groups of cases (Table 1). 51 patients with chronic Chagas disease in the indeterminate period, with normal electrocardiogram pre and post-therapy (N/N) belonged to group 1, their average age was 32.9 years; from them 40 (78.4%) had positive parasitological tests. Group 2 is formed of 16 patients with altered ECG at the beginning of the trial, chagasic cardiopathies with an average age of 33.9 years. 14 (87.5%) had positive parasitological tests. All of them normalized the ECG (C/N). 24 patients constituted group 3 with initial normal ECG, for this reason they were considered as control group, but between 6-12 months later, they presented ECG alterations, which due to ethical consideration obliged us to integrate them aleatory in one of the therapy groups (N/C). Their average age was 40.5 years. 17(70.8%) had positive parasitological tests. Group 4 is formed of 18 chagasic cardiopathies with altered tracings from the beginning which maintained so during the 11 years of follow up (C/C). The average age of this group was 35.9 years. 17(94.4%) of them had positive parasitological tests. There were no significative statistical differences in the positive parasitological results between the groups ($p > 005$).

In Table 2, we observed the results of the different parasitological tests after 11 years of treatment with ITRA or ALLO. 43 patients had positive XD (39.4%). 71 patients had positive PCRb (65.1%), 74 (67.9%) HYB, 47 PCRf (43.1%) and 54

12

(49.5%) HYF. Nevertheless that in 29, 20 and 51 cases, the last three assays were not performed.

In Tables 3, 4 and 5, we can observe the electrocardiographical tracings of the Groups 2 (N/C), 3 (N/C) and 4 (C/C).

The post therapy results showed that HYB and HYF had a greater positive percentage that obtained with PCRB and PCRF ($p < 0.05$). The results obtained with PCRF and XD were not statistically different ($p > 0.05$), but both had less positivity results that obtained with HYB and HYF ($p < 0.05$). Finally XD has less positive percentage that obtained with PCRB ($p < 0.05$).

When the positive parasitological results are analyzed in relation to the different electrocardiographic groups the following can be obtained: In group N/N the same parasitological results as in a normal group (already mentioned) are obtained. In group C/N there are not parasitological differences. In group N/C there are not statistically differences in the results of XD, PCRB and PCRF. This group maintain a lower percentage of positivity that obtained with HYB and HYF ($p < 0.05$). This situation is maintained in group C/C.

DISCUSSION

In our previous investigations we demonstrated that in a control group with the chronic indeterminate period of the disease, after 4 years, 10% of the infected persons developed Chagas cardiopathy (Arribada et al., 1989). In the Group 1 (N/N) followed during 11 years this was not observed, suggesting that ITRA and ALLO could have stop the natural evolution of the disease (Tables 1 and 2). Also in this group no mortality attributed to Chagas disease was observed. In group 2 (C/N) the results could be due to the effect of the therapy on an initial cardiopathy with minor electrocardiographic alterations (Table 3). The electrocardiographic tracings changed from normal to altered in all the patients of group 3 (N/C) and this condition didn't modify during the 11 years of follow up. The cardiopathy could be considered as recent due that the alterations were minors. There are not A-V, neither bifascicular blocks. This percentage of cardiopathies correspond to what we expected according to the time of evolution (11 years) of the initial indeterminate group (Table 4). The group 4 (C/C) had the mayor heart alterations which persist in time with minimal modifications. In this group one atrial arrhythmia, two incomplete right bundle branch blocks, one A-V block of 2 degree, and one auricular fibrillation associate to an incomplete right bundle branch blocks disappear. One case with initial prolonged QTC interval normalized the ECG, and two bifascicular blocks changed to monofascicular blocks (Table 5). There are new drugs against *T. cruzi* with good compliance in vitro and in experiments with mice, such as triazole derivates (posaconazole), inhibitors of

cruzipain the major protease of *T. cruzi*, active squalene synthase inhibitors and bisphosphonate risedronate (Ris) which inhibits the pyrophosphate synthase of the parasites (Urbina & Docampo, 2003; Garzoni et al., 2004; Urbina et al., 2004).

Up to day, none of this drugs as been used in humans, to know its efficiency and side effects. In relation to treat patients with chronic Chagas disease it will take at least 10-20 years to probe if one of this drugs is useful and safe.

Up to day, there is consensus to treat Chagas disease in all its periods, including the initial and intermediate chronic phase, due to the fact that parasites can be detected in this period. Based on this reason, we used five differents parasitological tests including PCR performed in the feces of triatomines applied to the same patients. As fare as we know there aren't investigations which relationated PCR in blood wich PCR in feces of triatomines in therapeutic surveys. The purpose of this, is to enhance the detection of kDNA of the parasite.

In 21 cases (19.3%), no parasites could be found with the five parasitological tests used. 13 of them (62%), maintain a normal ECG; 7 of these patients received ITRA and 6 ALLO. This cases, probably are "cured". Nevertheless, all of them had positive conventional serology (IF, ELISA). There are different hypothesis to explain "cure" (no parasite can be detected) and persistence of conventional serology in chronic Chagas patients (Ahmed & Gray, 1996) or common antigens between *T. cruzi* and normal flora of the gut. This inespecific antibodies can be avoid using recombinant antigens of *T. cruzi* (Gazzinelli et al., 1993). In this investigation, we didn't applicated this kind of antigens.

From the 54 (49.5%) cases with *T. cruzi* and normal ECG, 21 received ITRA and 33 ALLO. In Group 1 (N/N) and the Group 2 (C/N), the ECG maintained normal or changed to normal, respectively, nevertheless, that 78.4% and 87.5% had positive parasitological tests, in other words, they improve inspite the parasitemia. This results are different that observed by Basquiera et al., (2003), who found an association between the presence of DNA of *T. cruzi* (PCR) in blood and cardiac damage. With specific probes we could know the different strains involved in the ECG alterations. We are performing such study. Ornelas Toledo et al. (2003)., observed that *T. cruzi* I or zymodeme 1 are resistant to benznidazole and ITRA and *T. cruzi* II or zymodeme 2 are susceptible to ITRA in acute and in chronic infections in mice. Zymodeme 2 is the most frequent zymodeme observed in the domestic cycle of *T. cruzi* in Chile (Apt et al., 1997).

The presence of 70.8% Group 3 (N/C) and 94.4% Group 4 (C/C) of parasites, is other fact in favour of the none relation between cardiopathy and parasitemia.

The results of Table 2, confirmed that the universal probes are more sensitive than PCR and PCR is more sensitive than XD. It is important to perform all this tests because there are complementary, vgs. in 3 cases, PCR was the only positive test in this survey.

In relation to the drugs ITRA has less side effects than ALLO (Apt et al 1998) and has liveliness against *T. cruzi* (II, zymodeme 2), preventing and regressing the ECG alterations (Apt et al., 2003). For this reasons we believe that ITRA is the drug of choice to treat chronic Chagas disease in adults.

REFERENCES

- Ahmed, R. & Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: Understanding their relation. *Science* **272**, 54-60.
- Andrade, A., Zicker, F., Oliveira, R., Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L., Almeida, I., Andrade, S., Andrade, J. & Martelli, C. (1996). Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, **348**, 1407-1413.
- Apt, W., Aguilera, X., Arribada, A., Gómez, L., Miles, M. & Widmer, G. (1987). Epidemiology of Chagas disease in Northern Chile: Isoenzyme profile of *Trypanosoma cruzi* from domestic and selvatic transmission cycles and their associations with cardiopathy. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **37**, 302-307.
- Apt, W.; Aguilera, X.; Arribada, A.; Pérez, C.; Miranda, C.; Sánchez, G.; Zulantay, I.; Cortés, P.; Rodríguez, J. & Juri, D. (1998). Treatment of chronic Chagas disease with Itraconazole and Alopurinol. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **59**, 133-138.

- Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Sánchez, G., Vargas, L. & Rodríguez, J. (2003) Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American tripanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **97**, 23-29.
- Arribada A, Apt W & Ugarte J. (1986). A four year follow up surveys of chagasic cardiopathy in Chile. *Bulletin Pan American Health Organization*, **20**, 254-266.
- Basquiera, A., Sembaj, A., Aguerri, A., Omelianiuk, M., Guzmán, S., Moreno-Barral, J., Caeiro, T., Madoery, R. & Salomone O. (2003). Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction, *Heart*, **89**, 1186-1190.
- Cançado, C. (1999). Criteria of Chagas disease cure. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz*, **94**, 331-336.
- Cerisola, J. (1969). Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. *Boletín Chileno de Parasitología*, **24**, 54-59.

- De Souza, W. (2002). Review: From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinetoplastid Biology and Disease*, **1**, 1-21
- Gallerano, R., Marr, J. & Soza, R. (1990). Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **43**, 159-166.
- Garzoni, L., Caldera, A., Meirelles, M., de Castro, S., Docampo, R., Meints, G., Oldfield, E. & Urbina, J. (2004). Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risidronate on *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **23**, 273-285.
- Gazzinelli, R., Galvao, L., Krautz, G., Lima, A., Cancado, R., Sharfstein, J. & Krettli, A. (1993). Use of *Trypanosoma cruzi* purified glycoprotein (GP 57/51) or trypomastigote-shed antigens to assess cure for human Chagas disease. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **49**, 625-635.
- Marr, J. (1990). Purine analogs chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *Journal Laboratory Clinic Medicine*, **118**, 111-119.

- McCabe, E., Remington, J. & Araujo, F. (1986). In vitro and in vivo effect of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **35**, 280-284.
- Ornelas Toledo, M., Bahía, M., Carneiro, C., Martins-Filho, O., Tibayrenc, M., Barnabé, C., Tafuri, W. & Lana, M. (2003). Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **47**, 223-230.
- Pinto Dias, J.C. (2004). Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. XIIa. Reunión Intergubernamental. INCOSUR/Chagas, Santiago, Chile, 2003. 129 -134.
- Rodríguez Coura, J. & Castro, S. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, **97**, 3-24.
- Schenone, H.; Alfaro, E. & Rojas, A. (1974). Bases y rendimiento del xenodiagnóstico en la infección humana. *Boletín Chileno de Parasitología*, **29**, 24-26
- Solari, A.; Ortiz, S.; Soto, A.; Arancibia, C.; Campillay, R.; Contreras, P.; Salinas, A.; Rojas, A. & Schenone, H. (2001). Treatment of *Trypanosoma cruzi* –

- infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *Journal Antimicrobiological Chemotherapy*, **48**, 515-519.
- Sosa Stani, S., Segura, E., Ruiz, A., Velásquez, E., Porcel, B. & Yampotis, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, **59**, 526-529
- Tomomori-Yamashita, J., Daps, P., Almeida, D., Enokihara, M., De Seixas, M. & Freymuller, E. (1997). Cutaneous manifestations of Chagas disease after Heart transplantation: succesful treatment with allopurinol. *British Journal of Dermatology*, **37**, 626-630.
- Urbina J. & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitology*, **19**, 495-501.
- Urbina, J., Concepción, J., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T. & Hiyoshi, H. (2004). In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, **48**, 2379-2387.
- Wincker, P., Bosseno, N.F., Britto, C., Yaksic, N., Cardoso, M., Morel, C. & Breniere, S. (1994). High correlation between Chagas' disease serology and PCR-

based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in a edemic area. FEMS Microbiology Letters , **124**, 419-424.

World Health Organization (2000). Chagas disease interrupted in Chile. TDR News, **61**, 10. Geneva: WHO

World Health Organization (2002). Control of Chagas disease. Technical Reports Series N° 905. Geneva: WHO

Zulantay,I., Honores, P., Solari, A., Apt,W., Ortiz, S., Osuna,A., Rojas, A., López, B. & Sánchez, G. (2004). Use of polymerase chain reaction (PCR) and hybridizations assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic pacientes treated with itraconazole or allopurinol. Diagnostic Microbiology Infectious Disease, **48**, 253-257.

DECLARATION

I, WERNER APT, SENIOR AUTHOR of the paper entitled “ Clinical and parasitological results in chronic chagasic patients treated with itraconazole and allopurinol after 11 years of follow up”; which I have submitted for publication in the Annals of Tropical Medicine and Parasitology, hereby agree that, if it is accepted for publication in the journal, the copy-right of the paper shall become the property of The Liverpool School of Tropical Medicine who may on request licence me to reproduce the paper or any part thereof without requiring any payment in respect thereof, provided that a full acknowledgement to The Liverpool School of Tropical Medicine accompanies each reproduction. Any other authors have seen this article and have agreed that it be submitted for publication in the Journal.

23

Santiago, Chile, 27 december 2004

Prof. Dr. Werner Apt B.

I



REVISTA MEDICA DE CHILE

Santiago, junio 6 de 2005

Señor
Dr. Werner Apt
Laboratorio de Parasitología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile
Presente

Estimado Doctor Apt:

Tengo el agrado de comunicar a usted, que la versión corregida de su trabajo:

“La mejoría electrocardiográfica con el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, es independiente de la persistencia de *Trypanosoma cruzi*”

ha sido considerada satisfactoria en sus aspectos científicos. Su aprobación definitiva y su programación requerirán una revisión técnica por los Editores. Durante este proceso usted podría recibir llamados de los Editores, solicitándole información adicional o modificaciones formales.

Saluda atentamente a usted

Dr. Humberto Reyes B.
Editor
Revista Médica de Chile

X-Sieve: CMU Sieve 2.2
From: Revista Médica de Chile <revmedchile@smschile.cl>
To: "Werner Apt" <wapt@med.uchile.cl>
Subject: APROBACION ABSTRACT AUTORES.doc
Date: Mon, 5 Sep 2005 17:01:27 -0400
X-Mailer: Microsoft Outlook IMO, Build 9.0.2416 (9.0.2910.0)
Importance: Normal
X-Medicina-MailScanner-Information: Please contact the ISP for more information
X-Medicina-MailScanner: Found to be clean

Santiago, septiembre 5 de 2005

Señor
Dr. Werner Apt
Presente

Estimado Doctor Apt:

El texto adjunto corresponde a la versión propuesta por el Editor de Resúmenes en inglés para el resumen de su manuscrito.

Para poder mantener la programación de este manuscrito en el número de la Revista próxima a entrar en prensa, agradeceré a usted comunicarnos antes de 48 horas su conformidad con este texto o indicar su desacuerdo y los cambios que correspondería hacer.

Muy atentamente,

Dr. Humberto Reyes B.
Editor
Revista Médica de Chile



INES ZULANTAY.rtf

1 La persistencia de *Trypanosoma cruzi* en chagásicos crónicos tratados es independiente de la evolución electrocardiográfica en seguimiento prolongado

The persistence of Trypanosoma cruzi in chronic chagasic treated, is independent of the electrocardiographic evolution in long follow-up

Inés Zulantay A^{1a}, Arturo Arribada², Patricia Honores^{3b}, Gittith Sánchez P^{3c},

Aldo Solari I^{3d}, Sylvia Ortiz Z^{3e}, Antonio Osuna C^{4f}, Jorge Rodríguez^{5g}, Werner Apt B¹.

¹ Laboratorio de Parasitología Básico Clínico. Programa Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile² Departamento Medicina. Hospital San Borja Arriarán y Servicio de Cardiología. Clínica INDISA³ Laboratorio de Biología Molecular de Parásitos. Programa Biología Celular y Molecular. ICBM. Facultad de Medicina. Universidad de Chile⁴ Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. España⁵ Escuela de Salud Pública. Facultad de Medicina. Universidad de Chile.

^a Tecnólogo Médico. Magíster en Ciencias

^b Médico Veterinario

^c Biólogo. Doctor en Ciencias

^d Bioquímico. Doctor en Ciencias

^e Biólogo. Magíster en Ciencias

^f Químico Farmacéutico. Doctor en Ciencias

^g Estadístico. Magíster en Estadística

Correspondencia a:

Dr. Werner Apt. Teléfono 6786122. Fax 7356579 E-mail: wapt@med.uchile.cl

2256

PALABRAS

2

RESUMEN

Antecedentes: Actualmente, la evaluación del tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica es principalmente parasitológico. Las IgG anti-*Trypanosoma cruzi* se mantienen positivas prácticamente toda la vida y el trazado electrocardiográfico no es habitualmente utilizado como criterio clínico de mejoría.

Objetivo: Determinar, en seguimiento prolongado, si la persistencia del parásito en chagásicos crónicos tratados, se asocia con la evolución electrocardiográfica.

Pacientes y Métodos: 30 chagásicos crónicos que participaron de un ensayo clínico randomizado con itraconazol o alopurinol, bajo consentimiento informado y consideraciones éticas. Fueron clasificados según positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) del xenodiagnóstico, PCR en sangre periférica e hibridación,

aplicados siete años post-terapia. Anualmente, se realizó electrocardiograma (ECG) de 12 derivaciones, a doble ciego e interpretado según criterios establecidos.

Resultados: El Grupo I, lo conformaron 17 chagásicos, 10 con ECG normal y 7 con ECG alterado y el Grupo II 13 pacientes, 8 con ECG normal y 5 con ECG alterado. Independiente de la condición parasitológica, se obtuvo porcentajes de 90% y 88% de prevención, 58% y 50% de regresión y 10% y 13% de progresión para los Grupos I y II, respectivamente ($p>0.05$). **Conclusión:** La persistencia de *T. cruzi* en chagásicos crónicos tratados, es independiente de la evolución electrocardiográfica en seguimiento prolongado. Los efectos benéficos de los fármacos (regresión o prevención de anomalías electrocardiográficas), podrían ser parámetros a considerar como criterios de eficacia quimioterapéutica.

Palabras claves: Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Reacción de Polimerasa en Cadena (PCR), electrocardiograma (ECG).

226 PALABRAS

3

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, cuyo agente etiológico es *Trypanosoma cruzi*, constituye una importante causa de falla cardíaca. Cerca del 30% de los individuos infectados desarrollan cardiopatía chagásica crónica, la forma más severa de la enfermedad^{1,2}. En las fases más incipientes, las únicas formas de expresión de daño miocárdico pueden ser alteraciones discretas e inespecíficas del ECG. Posteriormente, el daño se manifiesta como un síndrome que incluye insuficiencia cardíaca, arritmias ventriculares graves y tromboembolismo pulmonar y sistémico³. Trabajos previos realizados en Chile, indican que aproximadamente el 30% de los individuos infectados por *T. cruzi* presentan algún grado de cardiopatía y de ellos, se estima que un tercio necesita marcapasos para sobrevivir^{4,5}.

La patogénesis de la enfermedad de Chagas aún no ha sido establecida^{6,7}. La falta de correlación entre la visualización microscópica del parásito y los intensos infiltrados de células mononucleares inflamatorias ricas en células T en tejidos afectados durante la fase crónica de la enfermedad de Chagas ha llevado a la formulación de la hipótesis autoinmune^{8,9}. Sin embargo, el rol patogénico directo del parásito ha generado fuerte apoyo posterior a la aplicación de nuevas técnicas inmunohistoquímicas y moleculares, las que han evidenciado una estrecha correlación entre la presencia del parásito y las lesiones tisulares^{7,10}.

La mayor sensibilidad para detectar *T. cruzi* de técnicas como Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o hibridación (HIB), en relación a métodos parasitológicos convencionales como el xenodiagnóstico (XD) o hemocultivo, las confirman como herramientas de elección en evaluaciones de eficacia quimioterapéutica¹¹⁻¹³.

Por otra parte, el trazado electrocardiográfico como criterio clínico de curación, ha sido desestimado por muchos investigadores, debido probablemente al lento desarrollo de las lesiones cardíacas. Establecer

algún tipo de correlación clínico-parasitológica, requiere de seguimientos post-terapia muy prolongados. Bajo estas condiciones, recientemente se ha reportado que itraconazol (ITRA) y alopurinol (ALO) tendrían efectos clínicos benéficos en la regresión de anomalías electrocardiográficas, más aún, ITRA parece tener un efecto protector contra el

4

desarrollo de nuevas alteraciones electrocardiográficas en los chagásicos crónicos tratados¹⁴.

El objetivo de este estudio es determinar, retrospectivamente, si la condición parasitológica de chagásicos crónicos tratados en seguimiento prolongado, establecida mediante XD, PCR e HIB, se asocia con la evolución (regresión o prevención) de las anomalías electrocardiográficas.

MATERIAL Y METODO

Pacientes: 30 chagásicos crónicos, 16 hombres y 14 mujeres, con edad promedio 33,2 años (rango 10 a 50), procedentes de áreas de la IV Región bajo control anti-*Triatoma infestans*¹⁵. Formaron parte de un ensayo clínico randomizado que evaluó eficacia y tolerancia de ITRA y ALO¹⁶. Se agruparon de acuerdo a la positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) de XD, PCR e HIB, aplicados en un período promedio de 84.1 meses post-terapia. 17 y 13 chagásicos crónicos conformaron ambos grupos, respectivamente (Tabla I).

Protocolo de tratamiento: ITRA (Laboratorio Janssen, Bélgica) fue recibido por 15 chagásicos en dosis única de 6 mg/Kg por 120 días. Los otros 15 participantes recibieron ALO (Laboratorio Silesia y Laboratorio Saval) en dosis única de 8.5 mg/Kg por 60 días. El protocolo de tratamiento fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y contó con el informe de consentimiento de todos los individuos que participaron en el estudio. Los fármacos fueron administrados por terapia directamente observada y la tolerancia para ambos fármacos fue considerada satisfactorias.

Evaluación electrocardiográfica: A todos los chagásicos en estudio, se les realizó evaluación electrocardiográfica antes del tratamiento, cada cuatro meses durante el primer año post-terapia y un control anual durante el período de seguimiento^{5,14}. Cada trazado fue codificado (según plantilla AP-P-PR-RR-RS-QT-QTC-AQRS-AT-ATH-rV1-SV1-RV5-Sokolow) e interpretado a doble ciego por cardiólogo especialista, según criterios establecidos para la cardiopatía chagásica crónica^{17,18}. Previamente se describe

5

la evolución natural de la cardiopatía chagásica crónica (control histórico) en individuos no tratados, cuya procedencia y edad es semejante a los individuos de este estudio¹⁹. Los criterios de exclusión de pacientes que participaron en el ensayo clínico con ITRA o ALO y cuyas cardiopatías no fueron atribuibles a enfermedad de Chagas, están previamente reportados¹⁴.

Xenodiagnóstico: Se aplicaron en condiciones de post-terapia y según técnica descrita²⁰, 4 cajas por paciente, cada una de las cuales contenía 7 ninfas de tercer o cuarto estadio de *Triatoma infestans*. Luego de su aplicación, las cajas fueron mantenidas a 27°C realizando examen microscópico de deyecciones de cada insecto a los 30, 60 y 90 días de incubación en búsqueda de las formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

Muestra de sangre para PCR: A cada paciente en condiciones de post-terapia, se le extrajo 5 ml de sangre venosa, mezclada con igual volumen de una solución de Guanidina-HCl 6M y EDTA 0.2 M (preservante y anticoagulante, respectivamente) e incubada a 98°C por 15 min para favorecer el desencadenamiento de la red de minicírculos de *T. cruzi*. Las muestras de sangre fueron tomadas en paralelo a la aplicación del XD y conservadas a 4°C hasta la extracción de ADN kinetoplastídico.

PCR

Los ensayos, fueron realizados según protocolo descrito¹¹. Brevemente, la extracción de ADN se realizó a partir de 500 µl del lisado utilizando fenol-cloroformo y precipitación con etanol. El ADN resuspendido en 50 µl de agua bidestilada fue cromatografiado en microcolumna P10 y mantenido a -20°C hasta su uso. 5 µl del ADN extraído fueron amplificados en un volumen final de 50 µl, conteniendo 0.26 mM de cada dNTP, 200 ng de los primers específicos (121 y 122), 2.5 U de Taq polimerasa y 5 µl de buffer 10x. La

amplificación se llevó a cabo en termociclador PTC-100 (MJ Research) y consistió en dos ciclos de 98°C por 2 min, 33 ciclos a 94°C por 1 min y 64°C por 1 min y una incubación final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz ultravioleta. Un producto de 330 pb representó un ensayo positivo. Todas las reacciones fueron realizadas en triplicado y en cada una de ellas se incluyó un control

negativo (ADN individuo no chagásico), un control positivo (kADN-*T. cruzi* de individuo chagásico) y un tubo sin ADN. Paralelamente, en todos los casos, un control externo de las reacciones de PCR se realizó en el Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España, utilizando esencialmente el mismo protocolo, a diferencia de la procedencia de primers y reactivos. Todas las muestras incluidas en el presente estudio, fueron positivas o negativas para PCR en ambos laboratorios.

Hibridación: Los ensayos se realizaron en duplicado según protocolo descrito²¹. El ADN amplificado fue transferido a membrana de nylon, denaturado y expuesto a luz ultravioleta. Las membranas fueron pre-hibridadas (SSC 5x, reactivo bloqueador 0.5% p/v, lauril sarcocinato de sodio 0.1% SDS 0.002% p/v) a 68°C por 2 horas, e hibridadas durante toda la noche a 68°C en la misma solución conteniendo kADN total de *T. cruzi* marcado con P₃₂. Posteriormente, las membranas fueron expuestas a autoradiografía entre 2 a 48 hrs y reveladas para su análisis. Se consideró positiva una señal de HIB con intensidad sobre el background de la película autoradiográfica.

Análisis Estadístico: Se utilizaron pruebas de chi cuadrado, Fisher y diferencias de porcentajes (prueba Z). Se consideró un error máximo aceptable de 0.05.

7

RESULTADOS

Como se ha descrito previamente, el criterio de inclusión de pacientes, fue la positividad (Grupo I) o negatividad (Grupo II) de XD, PCR e HIB.

En la Tabla I se observa que al inicio del tratamiento, el 59% de los pacientes del Grupo I tenía un ECG normal (10 de 17), en comparación con el 62% del Grupo II (8 de 13). ($p > 0.05$). Seis años después del tratamiento, el porcentaje de pacientes con ECG normal fue del 76% (13 de 17) en el Grupo I y del 77% (10 de 13) en el Grupo II ($p > 0.05$). De los chagásicos con ECG normal antes del tratamiento, sólo uno del Grupo I (10%) y uno del Grupo II (13%) alteraron su ECG.

Por otra parte, el 58% (4 de 7) de los chagásicos del Grupo I que tenían ECG alterado antes del tratamiento, evidenciaron regresión de las alteraciones electrocardiográficas en comparación con el 60% (3 de 5) del Grupo II.

En relación a los cambios benéficos globales, el 59% (7 de 12 casos) de los chagásicos con ECG alterado antes del tratamiento, revirtieron su ECG a un

trazado normal, en comparación con el 12% (2 de 18 casos) que progresó a un ECG alterado ($p < 0.0029$). En la Tabla II se detallan las alteraciones específicas del trazado electrocardiográfico observadas en 14 chagásicos crónicos antes y/o 7 años después de concluida la quimioterapia con ITRA o ALO. Las reversiones de ECG alterado a normal, se produjeron en todos los casos antes del año de concluida la terapia. Por el contrario, la aparición de las alteraciones electrocardiográficas descritas en los 14 casos, se registraron dentro de los tres primeros años post-tratamiento y se han mantenido en el período de seguimiento¹⁴. No se registró mortalidad en el grupo de pacientes evaluados en el presente estudio.

8

Tabla I

Evolución del trazado electrocardiográfico en chagásicos crónicos con XD, PCR e HIB positivo (Grupo I) o negativo (Grupo II), siete años post-terapia

	Pre-Terapia			Pre-Post-Terapia								Post-Terapia					
	N*		A**	N-N		A-A		N-A		A-N		N		A			
	N	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%		
Grupo I	17	10	59	7	41	9	90	3	43	1	10	4	58	13	76	4	24
Grupo II	13	8	62	5	38	7	88	2	40	1	13	3	60	10	77	3	23
Total	30	18	60	12	40	16	89	5	42	2	12	7	59	23	77	7	23

* N: ECG normal

** A: ECG alterado

9

Tabla II

Sexo, edad y alteraciones electrocardiográficas específicas pre y/o post-terapia observadas en 14* chagásicos crónicos tratados con ITRA o ALO evaluados en seguimiento prolongado (siete años)

Sexo	Edad**	ECG Pre-Terapia	Droga	ECG Post-Terapia	Grupo	n
M	50	N _a	ITRA	ISQ _b	I	1
M	32	N	ALLO	EXT VENT _c	II	1
F	10,24,20	QTP _d	ALLO (3)	N	I, I, II	3
M	47	BIRD _e	ALLO	N	II	1
M	13	HBAI _f	ITRA	N	II	1
F	23	RIT NOD _g	ALLO	N	I	1
M	31	HBAI+BIRD _h	ITRA	N	I	1
F	44	HBAI	ITRA	HBAI	I	1
M	31	HBAI+BCRD _i	ITRA	HBAI	I	1
F	44	HBAI+BAV _j	ALLO	HBAI	II	1
F	49	HBAI+ISQ _k	ITRA	HBAI+ISQ	II	1
F	47	HBAI+ISQ	ITRA	HBAI+ISQ+QT _l	I	1

^aECG normal

^bIsquemia

^cExtrasístole ventricular

^dQT prolongado

^eBloqueo incompleto de rama derecha

^fHemibloqueo anterior izquierdo

^gRitmo nodal

^hHemibloqueo anterior izquierdo + Bloqueo incompleto rama derecha

ⁱHemibloqueo anterior izquierdo + Bloqueo completo rama derecha

^jHemibloqueo anterior izquierdo + Bloqueo aurículo ventricular

^kHemibloqueo anterior izquierdo + Isquemia

^lHemibloqueo anterior izquierdo + Isquemia + QT prolongado

* 16 pacientes con ECG normal pre y post-terapia

** Al inicio de la terapia

10

DISCUSIÓN

La demostración permanente de *T. cruzi* en individuos chagásicos crónicos, revela la importancia de la enfermedad de Chagas en el continente latinoamericano y mantiene abierta la discusión acerca de la eficacia y tolerancia de las drogas utilizadas hasta hoy en el tratamiento etiológico de esta etapa de la afección 22,23.

Existe consenso que la enfermedad de Chagas debe ser tratada en cualquiera de sus períodos, exceptuando los casos crónicos terminales²⁴. No obstante, la evaluación de eficacia del tratamiento en la etapa crónica, aún constituye una problemática difícil de abordar. Si bien el desarrollo vertiginoso de la biología molecular ha permitido aumentar en forma considerable la sensibilidad de detección de *T. cruzi* en pacientes tratados^{25,26}, algunos autores estiman que la cura parasitológica no es viable de ser confirmada, aún con pruebas parasitológicas persistentemente negativas en seguimientos prolongados^{23,27}. Los estudios sobre evolución clínica en chagásicos crónicos tratados son controversiales y sin resultados concluyentes, siendo incluso descartado por algunos autores²⁷, debido probablemente a la necesidad de realizar seguimientos muy prolongados y a lo incierto de la patogénesis de la enfermedad^{23,28}. Se ha sugerido también considerar como criterio de cura, períodos prolongados de negativización o disminución de títulos anti-*T. cruzi* determinados por técnicas serológicas convencionales^{29,30} y desaparición de anticuerpos contra formas tripomastigotas vivas de *T. cruzi* detectados mediante ensayos de lisis mediada por complemento dependiente de anticuerpos¹² o citometría de flujo³¹.

En el presente estudio, se correlaciona la evolución electrocardiográfica (regresión y prevención de anomalías) en chagásicos crónicos tratados con ITRA o ALO y la condición parasitológica, siete años post-terapia. La conclusión más relevante, es que los efectos beneficiosos (prevención y regresión) de estos fármacos sobre la evolución del trazado electrocardiográfico, parecen ser independientes de la condición parasitológica. El 58% y 60% de reversión (ECG A/N) y el 90% y 88% de prevención (ECG N/N) observadas en los Grupos I y II, respectivamente, no constituyen diferencias estadísticamente significativas, al comparar con el 12% global de progresión (ECG N/A). Los rangos de reversión de las alteraciones electrocardiográficas (ECG

11

A/N) fueron mucho mayores que el 8.1% observado en el control histórico¹⁹. Al término del período de seguimiento, un 76% y un 77% de los pacientes de los grupos I y II, mantienen su ECG normal.

Nuestros resultados son concordantes a los obtenidos por Viotti y cols, que observan en individuos tratados con Benznidazol y evaluados durante 8 años post-terapia, una marcada reducción en el desarrollo de alteraciones electrocardiográficas y una menor frecuencia del deterioro de la condición clínica, a pesar de la persistencia de las pruebas parasitológicas positivas²⁸. En chagásicos no tratados, diversos estudios determinan que la parasitemia no se asocia a la evolución o condición clínica de los individuos chagásicos³²⁻³⁴, mientras que otros autores, establecen una estrecha correlación entre la persistencia de *T. cruzi* y la progresión de la enfermedad^{32,35,36}.

Segura y Andrade, han verificado que Benznidazol interrumpe la progresión de lesiones inflamatorias en ratones y animales crónicamente infectados con *T. cruzi*^{37,38}. Arribada y cols, estiman que cuando las anomalías electrocardiográficas son iniciales, es posible la regresión. Conversiones de alteraciones menores tales como QT prolongado y bloqueo auriculo-ventricular de 1° y 2° grado, pueden ser observadas incluso, en ausencia de tratamiento. La intervención quimioterapéutica puede causar así, reversión de anomalías más severas, tales como bloqueos fasciculares y bifasciculares, modificando la historia natural de la enfermedad⁴. En el presente estudio, las alteraciones que retornaron a

la normalidad, sugieren que eran de corta evolución, pues revirtieron en los primeros años de tratamiento.

El patrón inmunogenético del hospedero y la demostrada heterogeneidad de las poblaciones circulantes de *T. cruzi*, podrían ser factores que den cuenta de la independencia observada entre evolución clínica y parasitemia. Murta y cols, describen mayor susceptibilidad a Benznidazol y Nifurtimox en cepas de *T. cruzi* de perfil heterocigoto (zimodema B), predominante en áreas geográficas donde el tratamiento ha sido reportado como más exitoso³⁹. Toledo y cols, evidencian una fuerte correlación entre la divergencia filogenética de *T. cruzi* y su susceptibilidad a drogas *in vivo*. Aislados de genotipos 19 y 20 (*T. cruzi* I) fueron altamente resistente a ambas drogas, mientras que los genotipos 39 y 32 (*T. cruzi* II) fueron parcialmente resistentes, a pesar de la susceptibilidad de ITRA durante la fase crónica de la infección⁴⁰.

12

Los resultados obtenidos nos permiten sugerir, que la evaluación de eficacia quimioterapéutica en la enfermedad de Chagas crónica podría considerar, además de los criterios parasitológicos, los efectos benéficos de los fármacos sobre la regresión o prevención de anormalidades electrocardiográficas. El establecimiento de indicadores predictivos de una respuesta terapéutica eficaz, nos permitirá disminuir el impacto de progresión de la enfermedad de Chagas crónica.

13

REFERENCIAS

1. PRATA A. Clinical and epidemiological aspect of Chagas disease. *Lancet Inf Dis* 2000; 1: 92-100.
2. UMEZAWA E, SIMOSEN AM, CORBETT C, SHIKANAI-YOSUDA M. Chagas disease. *Lancet* 2001; 357: 797-799.
3. BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2º Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp. 2000.
4. ARRIBADA A, APT W, AGUILERA X, SOLARI A, UGARTE JM, SANDOVAL J ET AL. Cardiopatía chagásica en Chile. *Cardiol Int* 1993; 2:94-99.
5. APT W, AGUILERA X, ARRIBADA A, PEREZ C, MIRANDA C, SÁNCHEZ G ET AL. Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 133-138.
6. ZHANG L, TARLETON RL. Parasite persistence correlates with diseases and localization in chronic Chagas disease. *J Inf Dis* 1999; 180: 480-486.
7. LAGES-SILVA E, CREMA E, RAMIREZ LE, MACEDO AM, PEÑA SD, CHIARI E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megoesophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(5); 435-441.
8. CUNHA-NETO E, DURANTI M, GRUBER A, ZINGALES B, DE MESSIAS I, STOLF N ET AL. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of cardiac myosin-specific epitope cross-reactive to immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Procced Nat Acad Sc USA* 1995; 92: 3541-3545.

14

9. GOLGHER D, GAZZINELLI RT. Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease. *Autoimm* 2004; 37(5): 399-409.
10. JONES MJ, YABSLEY MJ, PUNG OJ, GRIJALVA MJ. Amplification of *Trypanosoma cruzi* specific DNA sequences in formalin-fixed raccon tissues using polymerase chain reaction. *J Parasitol* 2002; 88(5): 989-993.
11. SOLARI A, CAMPILLAY R, ORTIZ S, WALLACE A. Identification of *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in Chilean chagasic patients. *Exp Parasitol* 2001; 97: 226-233.
12. GALVAO LM, CHIARI E, MACEDO AM, LUQUETTI AO, SILVA SA, ANDRADE AL. PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J Clin Microbiol* 2003; 41(11): 5066-5070.
13. ZULANTAY I, HONORES P, SOLARI A, APT W, ORTIZ S, OSUNA A ET AL. Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and hybridization assays to detect *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients treated with itraconazole or allopurinol. *Diag Microbiol Inf Dis* 2004; 48(4): 253-257.
14. APT W, ARRIBADA A, ZULANTAY A, SÁNCHEZ G, VARGAS S, RODRÍGUEZ J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American tripanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol* 2003; 97(1): 23-29.
15. ZULANTAY I, BOZAN F, SALAS C, ZILLERUELO N, OSUNA A, GIL LC ET AL. Enfermedad de Chagas crónica. Ausencia de *Triatoma infestans* intradomiciliario y persistencia de *Trypanosoma cruzi* circulante post-terapia. *Parasitol Latinoam* 59: 93-98.
16. APT W, AGUILERA X, ARRIBADA A, PEREZ C, MIRANDA C, SANCHEZ G ET AL. Tratamiento de la enfermedad de Chagas humana crónica con Itraconazol y Alopurinol. Informe Preliminar. *Rev Med Chil* 1994; 122: 420-427.
17. MAGUIRE JH, MOTT KE, SOUZA JAA, CARVALHO E, BORGUES N. Clasificación de electrocardiograma y sistema abreviado de derivaciones para encuestas de poblaciones en relación a la enfermedad de Chagas. *Bol Of Sanit Panam* 1982; 93: 102-117.
18. LAZZARI J, PEREIRA M, ANTUNES C, GUIMARES A, MONCAYO A, DOMINGUEZ R ET AL. Diagnostic electrocardiography in epidemiological studies of Chagas disease: multicenter evaluation of a standarized method. *Pan Am J Pub H* 1998; 4:317-330.
19. ARRIBADA A, APT W, UGARTE J. A four year follow-up survey of chagasic cardiopathy in Chile. *Bull Pan American Health Org* 1986; 20: 254-266.
20. SCHENONE H. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 289-294.
21. SOLARI A, ORTIZ S, SOTO A, ARANCIBIA C, CAMPILLAY R, CONTRERAS MC ET AL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with nifurtimox: a 3 yeras follow-up by PCR. *J Antim Chem* 2001; 48(4): 515-519.
22. OPAS/OMS. Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas. Conclusiones de una Consulta Técnica. OPC/HPC/HCT/140/99,32 pp. *Rev Patol Trop* 1999; 28: 247-279.
23. RODRIGUEZ COURA J, DE CASTRO S. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(1): 3-24.

15

16

24. APT W. Tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Parasitol al Día* 1999; 23:100-112.
25. JUNQUEIRA ACV, CHIARI E, WINCKER P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods, for diagnosis of Chagas disease in endemic region of North-Eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 129-132.
26. BRITTO C, SILVEIRA C, CARDOSO MA, MARQUES P, LUQUETTI A, MACEDO V ET AL. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; 96: 823-826.
27. CANCADO R. Criteria of Chagas Disease Cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 331-335.
28. VIOTTI R, VIGLIANO C, ARMENTI H, SEGURA E. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994; 127: 151-162.
29. RASSI A, LUQUETTI AO. Therapy of Chagas disease. In: WENDEL S, BRENER Z, CAMARGO A, RASSI A (Eds). 1992. Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT. Sao Paulo, p.237-247.

30. SOSA ESTANI S, SEGURA EL, RUIZ AM, VELASQUEZ E, PORCEL BM, YAMPOTIS C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 526-529.
- 17
31. MARTINS-FILHO OA, PEREIRA ME, CARVALHO J, CANÇADO J, BRENER Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor efficacy of specific treatment in human Chagas disease. *Lab Immunol* 1995; 5: 569-573.
32. CASTRO C, PRATA A, MACEDO V. The influence of the parasitemia on the evolution of the chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(1):1-6.
33. MACEDO V. Indeterminate form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(1): 311-316.
34. MONTEON-PADILLA V, HERNÁNDEZ-BECERRIL N, BALLINAS-VERDUGO MA, ARANDA-FRAUST, REYES PA. Persistence of *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic cardiopathy patients. *Arch Med Res* 2001; 32(1): 39-43.
35. RANGEL-FLORES H, SANCHEZ B, MENDOZA-DUARTE J, BARNABE C, BRENIERE FS, RAMOS C ET AL Serologic and parasitologic demonstration of *Trypanosoma cruzi* infections in an urban area of central Mexico: correlation with electrocardiographic alterations. *Am J Trop Med Hyg* 2001; 65(6): 887-895.
36. BUSQUEIRA AL, SEMBAJ A, AGUERRI AM, OMELIANIUK M, GUZMÁN S, MORENO BARRAL CAERIO TF ET AL. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Heart* 2003; 89: 1186-1190.
37. SEGURA MA, MOLINA DE RASPI E, BASOMBRIO MA. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice, after late trypanocidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 213-216.
- 18
38. ANDRADE SG, STOCKER-GUERRET S, PIMENTEL AS. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991; 86: 187-200.
39. MURTA SMF, GAZZINELLI RT, BRENER Z, ROMANHA AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 93: 203-214.
40. TOLEDO MJ, BAHIA MT, CARNEIRO CM, MARTINS-FILHO OA, TIBAYRENC M, BARNABE C ET AL. Chemotherapy with benznidazole and Itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* genotypes. *Antimicrob Agents Chemoter* 2003; 47: 223-230.

19

Financiamiento

Este estudio fue financiado por los proyectos DI-SAL 03/6-2, Universidad de Chile y Fondecyt 1040731. Agradecemos el apoyo del Departamento de Investigación y Desarrollo de la Universidad de Chile y del Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.

