



Universitat Autònoma de Barcelona

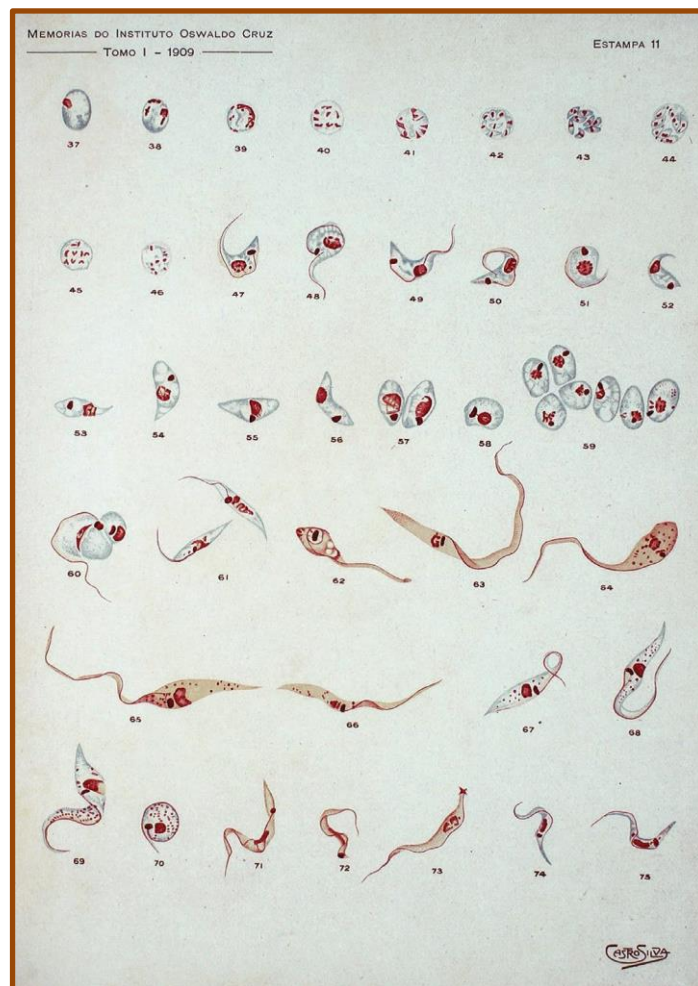
ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA EN UN ÁREA NO ENDÉMICA

Tesis Doctoral
Elena Sulleiro Igual



Directores: Tomàs Pumarola e Israel Molina
Tutora: Carmen Muñoz

Barcelona 2019



Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Programa de Doctorat en Microbiologia

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES
EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS
CRÓNICA EN UN ÁREA NO ENDÉMICA**

Tesis presentada por:

ELENA SULLEIRO IGUAL

Para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario

Vall d'Hebrón bajo la dirección de

Dr. TOMÀS PUMAROLA SUÑÉ y Dr. ISRAEL MOLINA ROMERO

Tutora:

Dra. CARMEN MUÑOZ BATET

Dr. Tomás Pumarola

Dr. Israel Molina

Dra. Carmen Muñoz

Elena Sulleiro

Barcelona, 2019



Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departament de Genètica i Microbiologia

Programa de Doctorat en Microbiologia

**APLICACIÓN DE LAS TÉCNICAS MOLECULARES
EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DE
PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS
CRÓNICA EN UN ÁREA NO ENDÉMICA**

Elena Sulleiro Igual, 2019

Tomàs Pumarola Suñé, Catedrático del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, **Israel Molina Romero**, Médico Adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebron y Director del Programa de Salud Internacional del Instituto Catalán de la Salud y **Carmen Muñoz Batet**, Jefa de Sección del Departamento de Microbiología del Hospital de la Santa Creu y San Pau y Profesora titular del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “**Aplicación de las técnicas moleculares en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica en un área no endémica**”, presentado por la Licenciada en Medicina y especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, Elena Sulleiro Igual, ha sido realizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal que corresponda.

Directores de Tesis Doctoral:

Tutora:

Dr. Tomás Pumarola Suñé

Dr. Israel Molina Romero

Dra. Carmen Muñoz Batet

Barcelona, Septiembre de 2019

A mis padres, sin su esfuerzo y su ilusión no habría llegado hasta aquí.

A Carlos, Samuel y Elisa, por todo.

AGRADECIMIENTOS

Quería agradecer esta Tesis a todas las personas que con su actividad diaria y su dedicación me han enseñado a querer y ejercer la Microbiología.

A todos los que me influyeron directa e indirectamente en mi labor en el diagnóstico microbiológico de las Enfermedades Tropicales y la Salud Internacional. Muy especialmente a todos los que hemos trabajado juntos en el Laboratorio de Drassanes, la Unidad de Parasitología del Hospital Vall d'Hebron y del hospital de Nossa Senhora da Paz en Cubal (Angola) así como a todos los integrantes del PROSICS Barcelona.

A mi familia. A mis padres, que construyeron la piña que somos y que como buenos docentes, nos inculcaron la importancia del trabajo en equipo. Mis hermanos, con los que he tenido la gran suerte de formar parte de este equipo, que siempre rema en la misma dirección. No puedo dejar de recordar a esa pequeña gran mujer que nos sigue cuidando desde las estrellas.

A Carlos. Esta tesis, al igual que otras muchas cosas, no es cosa mía sino de los dos. Sin su ayuda, apoyo y entusiasmo incondicional, conseguirlo habría sido imposible.

A Samuel y Elisa. Ellos son, sin duda, lo mejor que me ha pasado.

ABREVIATURAS

EC	Enfermedad de Chagas
ADN	Acido desoxirribonucleico
UDT	Unidad Discreta Tipificación
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
AVAD	Años de Vida Ajustados por Discapacidad
REDIVI	Red Cooperativa para el Estudio de Enfermedades Importadas por Viajeros e Inmigrantes
INCOSUR	Iniciativa Cono Sur
IFN γ	Interferon gamma
Th 1/2	Linfocitos T helper 1/2
NNN	Medio de Nicolle-Novy-MacNeal
LIT	Medio de Liver Infusion Tryptose
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
HAI	Hemaglutinación Indirecta
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
ELISA	Enzimoimmunoanálisis
CMIA	Inmunoensayo de micropartículas quimioluminiscente
CLIA	Inmunoensayo quimioluminiscente
RIPA	Radioinmunoprecipitación
TESA-blot	Trypomastigote excreted-secreted antigen-blot
Inno-LIA	Inmunoensayo en línea
GEB	Hidroclorhidro de Guanidina-EDTA buffer
SatDNA	ADN satélite
kDNA	ADN kinetoplasto
qPCR	PCR cuantitativa a tiempo real
CCE	Control Calidad Externo
LAMP	Amplificación isotérmica de ADN mediada por asas
BZL	Benznidazol

NFX	Nifurtimox
PROSICS	Programa Salud Internacional del Institut Català de la Salut
PSL	Posaconazol
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
ITT	Análisis por Intención de Tratamiento
PP	Análisis por protocolo
Pb	Pares de bases nitrogenadas
FW	Cebador forward
RV	Cebador reverse
P	Sonda TaqMan
<i>P</i>	Valor estadístico <i>P</i>
FAM	Fluoróforo sonda TaqMan FAM
Ct	Ciclo amplificación
INGEBI	Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
DE	Desviación Estandard
RIC	Rango InterCuartílico
ps	Parásito
a	Años
m	Meses
tx	Trasplante

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Prevalencia e incidencia estimada de EC en los principales países endémicos.

Tabla 2. Seroprevalencia de EC entre migrantes latinoamericanos en función del país de origen.

Tabla 3. Ensayos clínicos monitorizados mediante qPCR.

Tabla 4. Cronograma Ensayo clínico Chagasazol.

Tabla 5. EIA de antígeno recombinante utilizados durante el período de estudio.

Tabla 6. Secuencias cebadores y sonda qPCR *T.cruzi* utilizada en el estudio.

Tabla 7. Mezcla de qPCR correspondiente al protocolo qPCR-1 (período entre 2010 y mayo 2013).

Tabla 8. Mezcla de qPCR correspondiente al protocolo qPCR-2 (período entre mayo 2013 y 2018).

Tabla 9. Condiciones del termociclador correspondientes al protocolo qPCR-1.

Tabla 10. Condiciones del termociclador correspondientes al protocolo qPCR-2.

Tabla 11. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con parasitemia detectable.

Tabla 12. Tiempo de residencia fuera del área endémica.

Tabla 13. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con fracaso de tratamiento.

Tabla 14. Resultados cualitativos programa de CCE.

Tabla 15. Comparación valores de Ct entre los dos protocolos de qPCR utilizados.

Tabla 16. Características de las principales series españolas que utilizan la qPCR en la fase crónica de la EC.

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Dibujos originales de Carlos Chagas.

Figura 2. Cronograma de los primeros casos de EC en Latinoamérica.

Figura 3. Carlos Chagas y Salvador Mazza.

Figura 4. Distintas formas morfológicas de *T.cruzi*.

Figura 5. Distribución geográfica de las UDT de *T. cruzi* en el continente americano.

Figura 6. Transmisión vectorial de *T.cruzi*.

Figura 7. Transmisión vectorial y ciclo de vida de la infección por *T.cruzi*.

Figura 8. Prevalencia e incidencia estimada de EC en los principales países NO endémicos.

Figura 9. Comportamiento de la parasitemia y de la respuesta serológica en la EC.

Figura 10. Imagen de tripomastigotes de *T.cruzi* en gota gruesa y extensión de sangre periférica.

Figura 11. Mecanismos de acción de los fármacos con actividad antitripanocida.

Figura 12. Distribución de pacientes por años de residencia en nuestro país.

Figura 13. Porcentaje de pacientes con qPCR positiva distribuidos por años desde su llegada a nuestro país.

Figura 14. Seguimiento de pacientes con parasitemia intermitente.

Figura 15. Distribución de los pacientes en función del tiempo de seguimiento.

Figura 16. Seguimiento post-tratamiento de los pacientes con fracaso.

Figura 17. Randomización pacientes en las tres ramas del estudio Chagasazol.

Figura 18. Resultados de fracaso de tratamiento en las tres ramas del estudio Chagasazol en el análisis por intención de tratamiento.

Figura 19. Resultados de fracaso de tratamiento en las tres ramas del estudio Chagasazol en el análisis por protocolo.

Figura 20. Curva Kaplan-Meyer fracasos de tratamiento en las tres ramas del ensayo Chagasazol.

Figura 21. Esquema de diagnóstico y seguimiento de la EC crónica fuera del área endémica: propuesta basada en los resultados de esta Tesis.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	9
1.1.1. Reseña histórica del descubrimiento de <i>Schizotrypanum cruzi</i> y primeras descripciones de la Enfermedad de Chagas	9
1.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> : un parásito complejo	13
1.1.3. Mecanismos de transmisión	16
1.2. Epidemiología y mecanismos de control	20
1.3. Enfermedad de Chagas	26
1.3.1. Patogenia y Manifestaciones clínicas	26
1.3.2. Diagnóstico	29
1.3.2.1. Diagnóstico parasitológico	30
1.3.2.2. Diagnóstico serológico	32
1.3.2.3. Diagnóstico molecular	35
1.3.3. Tratamiento	38
1.3.4. Ensayos clínicos	40
2. JUSTIFICACIÓN	43
3. HIPÓTESIS	47
4. OBJETIVOS	51
4.1. Objetivo principal	53
4.2. Objetivos específicos	53
5. MATERIAL Y MÉTODOS	55
5.1. Diseño y población de estudio	57
5.1.1. Aportaciones de la PCR a tiempo real en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento	57

ÍNDICE

5.1.2. Utilidad de la PCR a tiempo real en el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica tratados con benznidazol	59
5.1.3. Utilidad de la PCR a tiempo real como marcador de fracaso de tratamiento con benznidazol o posaconazol en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas: ensayo clínico Chagasazol	60
5.2. Métodos serológicos	63
5.3. Métodos moleculares	64
5.4. Programa de control de calidad	67
5.5. Métodos estadísticos	68
5.6. Consideraciones éticas	69
5.7. Fuentes de financiación y conflicto de intereses	69
6. RESULTADOS	71
6.1. Aportaciones de la PCR a tiempo real en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento	73
6.2. Utilidad de la PCR a tiempo real en el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica tratados con benznidazol	78
6.3. Utilidad de la PCR a tiempo real como marcador de fracaso de tratamiento con benznidazol o posaconazol en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas: ensayo clínico Chagasazol	82
6.4. Resultados programa de control de calidad	85
7. DISCUSIÓN	89
8. CONCLUSIONES	107
9. PERSPECTIVAS DE FUTURO	113
10. CITAS BIBLIOGRÁFICAS	119
11. ANEXOS	139
11.1. Publicaciones basadas en los resultados de la Tesis	141
11.2. Otras publicaciones relacionadas	147

ÍNDICE

RESUMEN

La Enfermedad de Chagas (EC) es la enfermedad parasitaria más importante en América latina, donde es endémica. Debido a los movimientos migratorios de las últimas décadas, la EC se ha convertido en un problema de salud global. La EC presenta una fase aguda, caracterizada por una alta parasitemia, seguida de una fase crónica en la que la parasitemia es baja e intermitente. Por esta razón, la sensibilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en esta segunda fase es muy variable.

El objetivo de esta tesis es evaluar la utilidad de la técnica de la PCR a tiempo real (qPCR) en el diagnóstico y seguimiento de pacientes en la fase crónica de la EC seguidos en dos centros de Medicina Tropical en Barcelona.

La qPCR presenta baja sensibilidad en nuestra cohorte y un resultado positivo no se relaciona con la aparición de alteraciones viscerales características de la fase crónica. A pesar de ello, los resultados de parasitemia obtenidos en pacientes no tratados, pueden aportar datos sobre la dinámica del parásito y los diferentes factores que pueden influir en su presencia en sangre periférica.

Sin embargo, un resultado positivo de qPCR en pacientes tratados es un marcador útil para detectar fracasos de tratamiento, tanto en la práctica clínica habitual como en el contexto de ensayos clínicos.

En la cohorte seguida en nuestro centro, la tasa de fracaso a Benznidazol es muy baja. Sin embargo, el fracaso de dos pautas diferentes de Posaconazol, evaluadas en el contexto del ensayo clínico Chagasazol, fue cercana al 90%.

Según la experiencia recogida en esta tesis, en la fase crónica de la EC la mayor utilidad de la qPCR es la monitorización de la respuesta al tratamiento. Este

RESUMEN

seguimiento, a falta de nuevos biomarcadores precoces de curación, debe realizarse de forma periódica y durante un largo período de tiempo.

La utilización de un control de calidad externo de los resultados de qPCR confiere una mayor robustez a los resultados y permite evaluar de forma precoz los posibles errores de protocolo.

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is the most important parasitic disease in Latin America, where it is endemic. Due to the migratory movements of the last decades, CD has become a global health problem. CD presents a sharp phase characterized by high parasitaemia followed by a chronic phase in which the parasitaemia is low and intermittent.

For this reason, the polymerase's chain reaction (PCR) sensitivity in the chronic phase is variable.

The main objective of this thesis is to evaluate the usefulness of the real-time PCR technique (qPCR) in the diagnosis and monitoring of patients in the chronic phase of CD, followed in two centers of Tropical Medicine in Barcelona.

The qPCR shows low sensitivity in our cohort and a positive result is not related to the appearance of the visceral involvement characteristic of the chronic phase. Despite this, the results of parasitemia obtained in untreated patients can provide data on the dynamics of the parasite and the different factors that may influence its presence in peripheral blood.

However, a positive result of qPCR in treated patients is a good surrogate marker of therapeutic failure both in routine clinical practice and to evaluate new treatment patterns in clinical trials.

In the cohort followed in our center, the failure rate to Benznidazole was very low, which reinforces its effectiveness as trypanocidal. However, the failure of two different treatment regimes with Posaconazole, evaluated in the context of the Chagasazol clinical trial, was close to 90%.

According to the experience gathered in this thesis, the greatest utility of qPCR in the chronic phase of CD is monitoring the response to trypanocidal treatment. In the

ABSTRACT

absence of new early healing biomarkers, this monitoring should be carried out periodically and over a long period of time.

The use of external quality control of qPCR results makes them more robust and allows an early evaluation of possible protocol errors.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Trypanosoma cruzi*

1.1.1. Reseña histórica del descubrimiento de *Schizotrypanum cruzi* y primeras descripciones de la Enfermedad de Chagas

La Enfermedad de Chagas (EC) es una infección parasitaria producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. La enfermedad es endémica en 21 países de América latina desde el Sur de Estados Unidos hasta el sur de Argentina y Chile, exceptuando las islas del Caribe (1).

La primera descripción del parásito y la enfermedad la realizó el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934) en 1909 mientras estaba realizando una investigación sobre posibles vectores de malaria en la ciudad brasileña de Lassance, en la región de Minas Gerais en Brasil.

Chagas que entonces era investigador del Instituto Oswaldo Cruz, del que sería director desde 1917 hasta su fallecimiento, descubrió la presencia de unos triatomíneos hematófagos (*Panstrongylus megistus*), denominados comúnmente barbeiros que se encontraban en el interior de los domicilios donde se alimentaban de sangre tanto de personas como de animales domésticos. Al diseccionar los triatomíneos descubrió la presencia de un parásito en su interior al que denominó *Schizotrypanum cruzi* en honor a su maestro Oswaldo Cruz (2).

El 14 de febrero de 1909, consultaron al Dr Chagas el caso de una niña de un año llamada Berenice, que vivía en una de las casas infestadas, por fiebre alta, hepatoesplenomegalia y edema facial. Al examinar la sangre de esta niña observó los mismos parásitos que había descubierto en el triatomíneo. Berenice fue la primera paciente diagnosticada de EC.

INTRODUCCIÓN

Además de reconocer estos síntomas secundarios a la picadura del triatomino, Chagas también intuyó la cronicidad de la enfermedad, al relacionar la presencia de un bocio endógeno y las frecuentes bradicardias y extrasístoles que presentaban los habitantes de la región, con la infección.

Por tanto, en un trabajo único en la historia de la parasitología y la medicina, Carlos Chagas describió las características más importantes de una nueva enfermedad: el vector, el parásito y su ciclo biológico, algunos de los hospedadores implicados, sus manifestaciones clínicas, su epidemiología e incluso su profilaxis (3).

Debido a su descubrimiento Chagas se convirtió en miembro de la Academia Nacional de Medicina de Brasil y recibió varios premios y títulos de instituciones nacionales e internacionales. Fue nominado dos veces para el Premio Nobel en Medicina y Fisiología (1913 y 1921), que nunca consiguió debido probablemente a desavenencias políticas (4).



Figura 1. Dibujos originales de Carlos Chagas. Fuente: Chagas C. Mem Inst Oswaldo Cruz 1159–218.

Tras la muerte de Carlos Chagas se intensificó el estudio de la enfermedad en Brasil. Múltiples investigadores, que incluían a su propio hijo Evandro Chagas, completaron los estudios del parásito, de los vectores implicados y confirmaron la existencia de la

INTRODUCCIÓN

fase crónica de la enfermedad, llegando a describir algunas de las alteraciones cardíacas características de la EC mediante los primeros estudios electrocardiográficos (1).

Al poco tiempo empezaron a describirse los primeros casos fuera de Brasil, en El Salvador en 1913 y en Perú y en Venezuela a los que siguieron el resto de países en Latinoamérica (3).

A pesar de que el parásito se descubrió hace apenas un siglo, estudios paleobiológicos han permitido detectar ADN de *T. cruzi* en momias del desierto de Atacama que datan de 4000 años antes de Cristo, lo que demuestra que la enfermedad ha existido en América Latina durante más de 9.000 años (5).

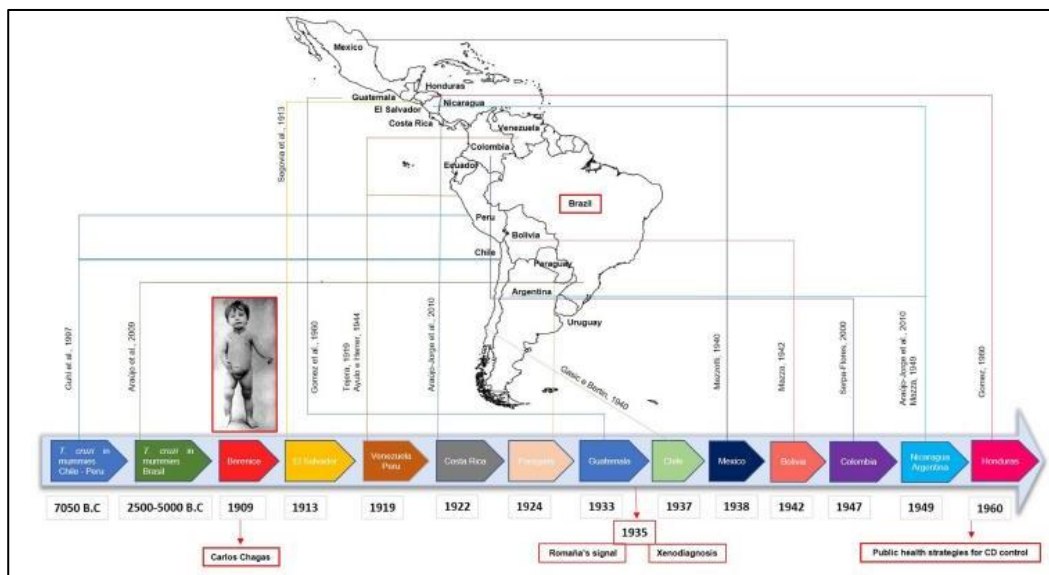


Figura 2. Cronograma de los primeros casos de EC en Latinoamérica. Fuente: Lidani et al. Front Public Heal 2019;7:166.

Una mención especial en las primeras investigaciones de esta enfermedad la merece el médico argentino Salvador Mazza. Tras la descripción de la enfermedad por parte de Carlos Chagas, en Argentina se iniciaron los primeros estudios para determinar la existencia de la enfermedad en su territorio. A pesar de detectar triatominos infectados, se desechó la idea de que hubiese EC en Argentina debido a que “la

INTRODUCCIÓN

vinchuca infectada en la República Argentina no produce la enfermedad de Chagas [probablemente debido a] una atenuación del tripanosoma por el clima” (6).

No fue hasta el principio de los años 30 que el grupo de investigadores liderados por Mazza describió el primer caso en humanos en Argentina así como la implicación de otros mamíferos hospedadores. Este prolífico investigador describió clínicamente la fase aguda de la enfermedad en más de 1200 casos (7).

La importancia de sus descubrimientos hizo que incluso se propusiera cambiar el nombre de la enfermedad por el de Chagas-Mazza.



Figura 3. Carlos Chagas (izquierda) y Salvador Mazza (derecha).

No fue hasta 1967 que Bayer comercializó el Nifurtimox (Lampit®) seguido en 1972 del Benznidazol (Rochagan® y Radanil®, Roche), los dos fármacos utilizados para el tratamiento de la EC y que persisten hasta la actualidad.

Otro hito en la evolución histórica de la EC fue el desarrollo en la década de los 90 de las técnicas de detección de ADN de *T.cruzi* que han permitido un avance no sólo en el diagnóstico de la enfermedad, sino en el conocimiento de su diversidad genética, de la patogénesis de la enfermedad, principalmente de la fase crónica y en consecuencia de las pautas de tratamiento y manejo clínico de la EC en la actualidad.

1.1.2. *Trypanosoma cruzi*: un parásito complejo

T. cruzi es un parásito hemoflagelado que pertenece al orden *Kinetoplastida*, clase *Kinetoplastea*, familia *Trypanosomatidae* (8)(9).

Durante su ciclo de vida presenta tres formas morfológicas diferentes y las tres con capacidad de transmitir la infección.

El **amastigote**, es de localización intracelular y es la forma de división en el mamífero. Se divide por fisión binaria y genera una estructuras con múltiples amastigotes en el interior celular que son las responsables de su destrucción. Mide de 2-4 μ m de tamaño y puede encontrarse en el interior de cualquier célula nucleada, principalmente las de origen mesenquimal (10).

El **trypomastigote** es la forma extracelular en el mamífero. Mide de 16-20 μ m y se encuentra circulante en sangre periférica o en el intestino terminal del reduviro (trypomastigote metacíclico). No tiene capacidad de división pero propaga la infección a otras localizaciones dentro del organismo y a otros mamíferos a partir de las heces del vector.

El **epimastigote** es la forma en la que se encuentra en el tracto digestivo del vector y en los cultivos "in vitro". Tienen capacidad de división en el intestino del triatomino donde se transforman en trypomastigotes metacíclicos infectantes (11).

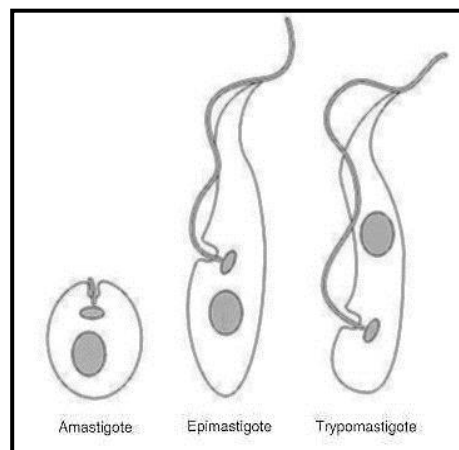


Figura 4. Distintas formas morfológicas de *T.cruzi*.

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista morfológico *T. cruzi*, como el resto de *Trypanosomatidae*, presenta un orgánulo llamado kinetoplasto que contiene material genético.

Las formas extracelulares, tripomastigote y epimastigote, poseen una membrana ondulante muy característica que recorre el citoplasma y se continúa en un único flagelo libre. La forma del citoplasma, la longitud del flagelo y la disposición del kinetoplasto permiten la diferencia morfológica entre estas dos formas evolutivas (12).

Complejidad genética y Unidades Discretas de Tipificación (UDT)

T. cruzi es un microorganismo muy complejo desde el punto de vista genético y antigénico. Su forma de propagación es clonal, pero simultáneamente es capaz de realizar procesos de intercambio genético y de recombinación que dan lugar a una población muy heterogénea (13).

La aplicación de técnicas moleculares con gran capacidad de discriminación ha permitido clasificar a *T. cruzi* en distintos linajes o Unidades Discretas de Tipificación (UDT). Se define como UDT diferentes grupos taxonómicos identificables por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes (14). Las UDT pueden considerarse familias clonales estrechamente relacionadas pero no un único clon y con la suficiente relación como para no clasificarse como especies diferentes (15).

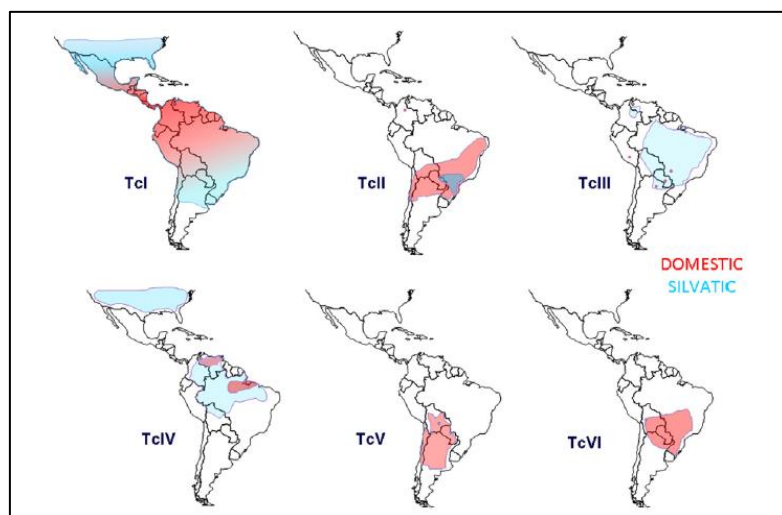


Figura 5. Distribución geográfica de las UDT de *T. cruzi* en el continente americano. Fuente: Zingales B, et al. Infect Genet Evol 2012;12(2):240–53.

INTRODUCCIÓN

Actualmente se acepta que existen seis linajes diferentes (TcI a TcVI) que cumplen estas características (16). En los últimos años se ha descrito un nuevo linaje independiente, TcBat asociado inicialmente con la infección en murciélagos, como causa de infección en humanos (17).

TcI es la UDT más frecuente, se localiza principalmente en América Central y se ha asociado a mayor daño cardíaco. Tc II, Tc V y Tc VI se distribuyen principalmente en América del sur, siendo TcV es más frecuente en Argentina, Bolivia y Paraguay y TcVI en el Gran Chaco. Tc III y Tc IV generalmente no producen infección en humanos (16). La heterogeneidad genética va más allá de la UDT y se han descrito sublinajes, como ocurre en el caso de TcI donde están bien caracterizados (18). También se conoce la presencia de infecciones mixtas en las que coexisten varias UDT simultáneamente.

La gran relevancia de la definición y el estudio de las diferentes UDT ha sido redefinir algunos aspectos de esta enfermedad: la distribución geográfica de cada linaje dentro del área endémica, los distintos nichos ecológicos implicados en la transmisión vectorial, los ciclos de transmisión y un mejor conocimiento de la patogénesis de la enfermedad.

Existen múltiples estudios que intentan relacionar el linaje del parásito con las manifestaciones clínicas y la gravedad de la enfermedad (19)(20)(21). También se ha podido demostrado la presencia de diferentes poblaciones de *T.cruzi* en la sangre y distintos tejidos, sugiriendo el tropismo selectivo de algunas UDT (que puedan condicionar por ejemplo una mayor predisposición para la transmisión congénita) o a una selección de linajes secundario a un proceso de inmunosupresión (22)(23)(24)(25). Los estudios de tipado también se han utilizado en la caracterización de brotes e incluso para determinar la posible selección de UDT resistentes tras el tratamiento tripanocida (26)(27).

1.1.3. Mecanismos de transmisión

Transmisión vectorial

La EC es una zoonosis en la que actúan como reservorio diversos mamíferos tanto domésticos (perros, gatos, cobayas) como selváticos (roedores, marsupiales, armadillo) implicados, junto al humano y el vector, en tres ciclos de transmisión: doméstico, peridoméstico y selvático (11).

La vía de transmisión más frecuente en el área endémica es la vectorial, a partir de triatominos que son conocidos por distintos nombres populares en función del área geográfica (vinchuca, barbeiro, chinche besucona o picuda...). Se trata de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, subfamilia *Triatominae*, de las que existen más de 140 especies capaces de transmitir la EC. Las más frecuentes pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* y son: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, *Triatoma maculata*, *Panstrongylus geniculatus*, *Rhodnius ecuadoriensis* y *Rhodnius pallescens* (28).

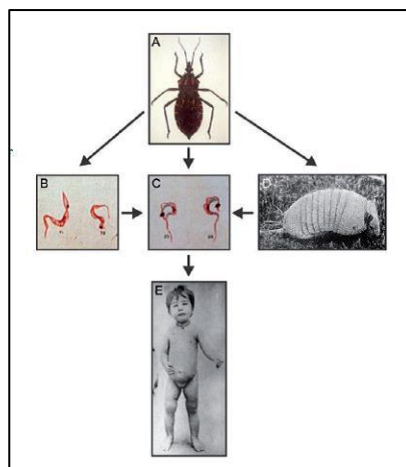


Figura 6. Transmisión vectorial de *T.cruzi*. Fuente: Rodrigues Coura et al. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro. 2014;109(7):856–62.

INTRODUCCIÓN

Estos vectores presentes en la zona peridomiliar, al alimentarse de sangre de animales o humanos, defecan liberando los tripomastigotes metacíclicos presentes en su intestino. Estas heces poseen un material irritante que provoca el rascado. Éste, a su vez, produce pequeñas escoraciones en la piel o mucosas por las que penetra el parásito, invadiendo las células mesenquimales en cuyo interior se transforma en forma amastigota. El amastigote se multiplica en las células hasta que finalmente estallan produciendo la invasión de nuevas células por contigüidad o bien transformándose en forma tripomastigota por la que se diseminará vía hematógica hacia otras localizaciones e invadiendo nuevas células. El ciclo se completa cuando un nuevo triatominos se alimenta de sangre de un hospedador infectado adquiriendo tripomastigotes circulantes de un individuo con parasitemia que se transformarán en su intestino en epimastigotes que darán lugar de nuevo a tripomastigotes metacíclicos (10).

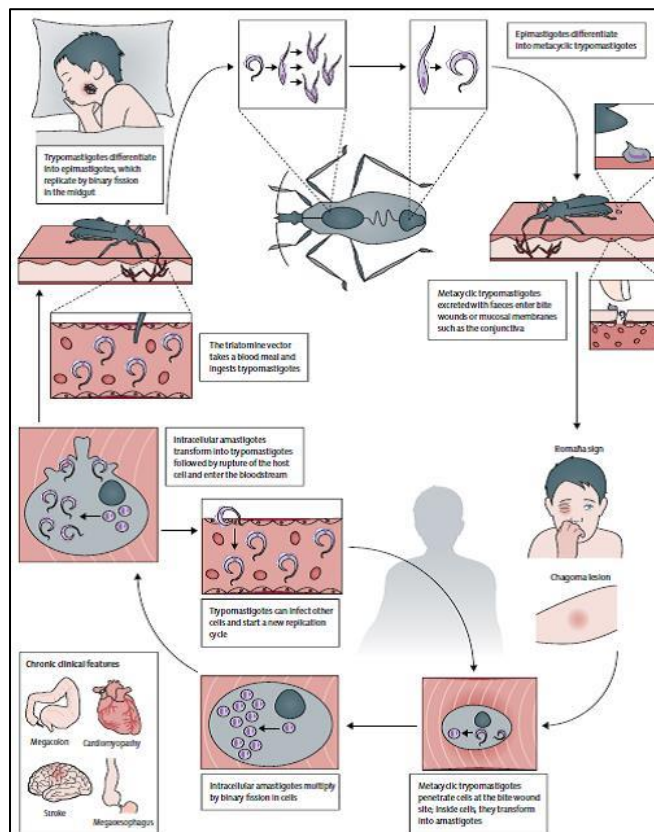


Figura 7. Transmisión vectorial y ciclo de vida de la infección por *T.cruzi*. Fuente: Perez Molina and Molina. Lancet 2018;391(10115):82–94

Transmisión congénita

Debido a los importantes esfuerzos por reducir la transmisión vectorial, la transmisión vertical madre-hijo se ha convertido en una de las principales vía de transmisión de la EC (29).

La proceso de transmisión no se conoce completamente y en el se implican distintos factores: placentarios, maternos como la inmunosupresión relativa durante la gestación, fetales como la capacidad inmunológica del feto a hacer frente a la infección y otros intrínsecos del parásito como la parasitemia o la UDT que condiciona su histotropismo por la placenta (30)(31).

De todos ellos, la parasitemia detectada en el tercer trimestre de la gestación es el factor de riesgo que más se ha asociado con la posibilidad de transmisión de la infección al feto (32)(33)(34). Esta asociación es tan robusta, que se ha llegado a proponer realizar diagnóstico postnatal únicamente en los recién nacidos de madres que presenten parasitemia detectable mediante técnicas de alta sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que sólo estos presentarían riesgo de infección (35).

Una particularidad de la transmisión congénita de esta infección es la posibilidad de transmisión de una generación a otra.

Transmisión mediante transfusión de hemoderivados

La transmisión de la EC se puede producir a partir de distintos tipos de hemoderivados provenientes de donantes con tripomastigotes circulantes.

Se han descrito casos de transmisión a partir de sangre completa, concentrados de hematíes y plaquetas e incluso colonias de granulocitos, pero no de plasma. No todos presentan el mismo riesgo, siendo los concentrados de plaquetas los que presentan más riesgo, debido principalmente a la gran cantidad de sangre que requiere filtrarse para conseguirlos (36).

Otros factores de riesgo para la transmisión son el volumen de sangre transfundido, la UDT del parásito que determina su histotropismo, la carga parasitaria del donante, el estado inmunitario del receptor o la correcta conservación de los productos sanguíneos (37).

Transmisión mediante trasplante de órganos

La infección por *T.cruzi* se puede transmitir de un donante de órganos seropositivo a un receptor seronegativo (38). La EC es contraindicación absoluta cuando el donante se encuentra en fase aguda o cuando los órganos implicados son el corazón y/o el intestino, pero no en el caso del riñón, el hígado o los pulmones (39). El riesgo de transmisión depende del órgano trasplantado, siendo mayor en el caso del corazón (75%), respecto al pulmón (66.6%), el hígado (29%) o al riñón (18-19%) (40).

En los receptores seronegativos de un donante infectado es necesario monitorizar la posibilidad de transmisión en el post-trasplante. La infección en el receptor puede presentarse con manifestaciones graves más propias de la forma aguda, con el agravante de la inmunosupresión y las co-morbilidades propias del proceso (41)(42)(43). En nuestra experiencia, se han realizado trasplantes tanto hepático como pulmonar de donantes con EC a receptores seronegativos. En todos los casos se realizó tratamiento que fue bien tolerado además de una estrecha monitorización posterior mediante PCR del receptor sin detectarse transmisión en ninguno de los casos (44)(45).

En el caso de pacientes con EC que han de ser sometidos a trasplante es necesario realizar el cribado y tratamiento de la EC previo a la inmunosupresión además de una estrecha monitorización post-trasplante debido al riesgo de reactivación (43)(46).

Transmisión oral

La transmisión oral se produce a partir de alimentos o bebidas contaminados con heces de triatomíneos donde están presentes los tripomastigotes metacíclicos (47).

INTRODUCCIÓN

Muchos de estos casos se presentan en forma de brotes de infección aguda que son potencialmente graves debido a la alta carga parasitaria presente en el alimento o bebida ingerida.

Se han descrito brotes en varios países, algunos de ellos con un importante número de afectados, asociados al consumo de bebidas muy populares como el jugo de caña de azúcar o de açai (48)(49).

Otras formas de transmisión

Existen vías de transmisión anecdóticas como los accidentes de laboratorio o la transmisión sexual que se ha descrito también en humanos (50)

1.2. Epidemiología y mecanismos de control

La EC es la enfermedad parasitaria más importante de América latina y es una de las infecciones incluidas en la lista de enfermedades olvidadas de la OMS (51).

Se considera que afecta entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, produciéndose cada año 28.000 casos nuevos y 12.000 muertes (52).

La carga económica de la EC es comparable e incluso supera la de otras enfermedades como la infección por rotavirus o el cáncer de cérvix secundario a la infección por virus del papiloma humano. Esto se debe a su carácter crónico y a la pérdida temprana de productividad, así como por los costes de la atención médica que supone principalmente el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de las cardiopatías avanzadas. En promedio, a nivel mundial, la carga de morbilidad de la EC está estimada en 627,46 millones de dólares en costos de atención médica y 806,170 años de vida ajustada por discapacidad (AVAD) anualmente (53).

La EC se ha asociado tradicionalmente a las zonas rurales de América latina debido a que las malas condiciones de las viviendas, principalmente de las comunidades más

INTRODUCCIÓN

pobres, son las que presentan condiciones óptimas para la transmisión vectorial de la enfermedad (52).

Entre los países endémicos, los que presentan una mayor prevalencia e incidencia de EC son Bolivia, Argentina, Paraguay, Ecuador, El Salvador y Guatemala (10).

TABLE 1 | Estimated number of infected individuals and people at risk of infection in Latin America from 1980 to 2010.

	1980-1985		2005		2010	
	Infected individuals	Individuals at risk of infection (%)	Infected individuals	Individuals at risk of infection (%)	Infected individuals	Individuals at risk of infection (%)
SOUTHERN CONE						
Argentina	2,640,000 (10%)	23	1,600,000 (4.1%)	23	1,505,235 (3.64%)	5.42
Bolivia	1,300,000 (24%)	32	620,000 (6.8%)	32	607,186 (6.1%)	5.9
Brazil	6,180,000 (4.2%)	32	1,900,000 (1%)	32	1,156,821 (0.6%)	13.4
Chile	1,460,000 (16.9%)	63	160,200 (1%)	63	119,660 (0.7%)	0
Paraguay	397,000 (21.4%)	31	150,000 (2.5%)	31	184,669 (2.13%)	19.6
Uruguay	37,000 (3.4%)	33	21,700 (0.7%)	33	7,852 (0.23%)	0
ANDEAN INITIATIVE						
Colombia	900,000 (30%)	11	436,000 (1%)	11	437,960 (0.95%)	10.5
Ecuador	30,000 (10.7%)	41	230,000 (1.7%)	47	199,872 (1.38%)	28.9
Peru	621,000 (9.8%)	39	192,000 (0.7%)	12	127,262 (0.43%)	4.5
Venezuela	1,200,000 (3%)	72	310,000 (1.2%)	18	193,339 (0.71%)	3.8
CENTRAL AMERICA						
Belize	–	–	2,000 (0.7%)	50	1,040 (0.3%)	22.3
Costa Rica	130,000 (11.7%)	45	23,000 (0.5%)	23	7,667 (0.16%)	5.2
El Salvador	900,000 (20%)	45	232,000 (3.4%)	39	90,222 (1.3%)	15.9
Guatemala	1,100,000 (16.6%)	54	250,000 (2%)	17	166,667 (1.2%)	10.3
Honduras	300,000 (15.2%)	47	220,000 (3.1%)	49	73,333 (9.2%)	14.6
NICARAGUA	–	–	58,600 (1.1%)	25	29,300 (0.52%)	11.5
Panama	200,000 (17.7%)	47	21,000 (0.01%)	31	18,337 (5.2%)	13.1
Mexico	–	–	1,100,000 (1%)	28	876,459 (7.8%)	20.9
*Guianas/Suriname	–	–	–	–	12,600 (0.8%)	25.1
Total	17,395,000 (4.3%)	25	7,694,500 (1.4%)	20	5,742,167 (1.1%)	12.9

Tabla 1. Prevalencia e incidencia estimada de EC en los principales países endémicos. Fuente: Lidani et al. Front Public Heal 2019; 7:166.

En los últimos años se han producido importantes cambios en la epidemiología de la EC. Por una parte, se ha producido una disminución de la incidencia de la enfermedad. Hay múltiples factores implicados en esta tendencia: el establecimiento de políticas de control de las distintas vías de transmisión, la mejora del acceso al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad que implica una reducción de la carga de enfermedad y por último al fallecimiento de los pacientes crónicos.

El otro gran cambio deriva de los movimientos migratorios que se han producido en las últimas décadas. Estos movimientos de personas desde las zonas rurales de América latina hacia las ciudades y principalmente a países fuera del continente ha hecho que se detecten casos de la EC fuera de las zonas tradicionalmente afectadas e incluso fuera del área endémica.

INTRODUCCIÓN

El mayor flujo de inmigrantes latinoamericanos se registra en Norteamérica (Estados Unidos y Canadá), seguido de Europa y el oeste del Pacífico (Australia, Nueva Zelanda y Japón) (3). Esta universalización de la enfermedad ha convertido a la EC en un problema de salud global (54).

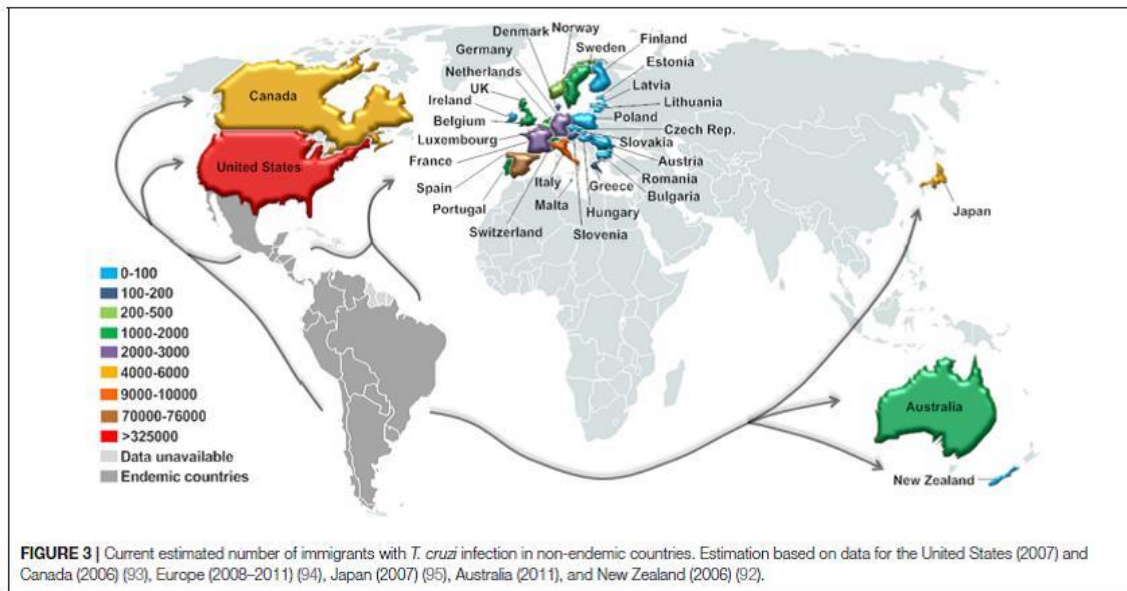


Figura 8. Prevalencia e incidencia estimada de EC en los principales países NO endémicos. Fuente: Lidani et al. Front Public Heal 2019;7:166.

Se estima que entre 68.000 y 120.000 personas infectadas por *T. cruzi* viven actualmente en Europa (55). Debido a las importantes relaciones lingüísticas y socio-culturales con América latina, España es el país con mayor número de inmigrantes latinoamericanos y por tanto de personas infectadas por *T. cruzi* en el continente europeo (56).

La EC es la enfermedad más frecuentemente diagnosticada en inmigrantes de origen latinoamericano en España, llegando a un 40% de infectados en este colectivo, según datos recogidas en la Red Cooperativa para el Estudio de Enfermedades Importadas por Viajeros e Inmigrantes (REDIVI) y al 53.8% según datos propios de nuestro grupo (57)(58). Con respecto al origen de las pacientes infectados, la mayor seroprevalencia

INTRODUCCIÓN

de EC se encuentra en personas de origen boliviano (18%), seguidos de El Salvador (5.6%), Paraguay (5.5%), Nicaragua (4.6%) y Honduras (3.7%) (59).

En áreas no endémicas donde no hay posibilidad de transmisión vectorial ni oral, las vías de transmisión más frecuentes son la transmisión congénita, las transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos (3)(56).

Country	Number screened	Number of seropositives	Country-specific prevalence* (%)	95% CI	Prevalence in country of origin (National level) PAHO (%) ^[39]	Prevalence ratio
Argentina	875	16	2.2	0.80–4.13	4.13	0.53
Bolivia	2264	541	18	13.9–22.66	6.75	2.67
Brazil	954	4	0.6	0.16–1.12	1.02	0.59
Chile	290	1	1	0.17–2.36	0.99	1.01
Colombia	1627	6	0.5	0.15–0.92	0.96	0.52
Ecuador	2131	7	0.4	0.18–0.72	1.74	0.23
El Salvador	67	2	3.7	1.62–11.7	3.37	1.10
Honduras	136	3	4.2	1.27–7.36	3.05	1.38
Mexico	166	0	1.5 [^]	0.24–3.76	1.03	1.46
Nicaragua	50	1	4.6	0.76–11.3	1.14	4.04
Paraguay	385	19	5.5	3.46–7.91	2.54	2.17
Peru	1029	4	0.6	0.23–1.18	0.69	0.87
Uruguay	248	0	0.8 [^]	0.08–2.24	0.66	1.21
Venezuela	311	0	0.9 [^]	0.16–2.22	1.16	0.78

Tabla 2. Seroprevalencia de EC entre migrantes latinoamericanos en función del país de origen. Fuente: Requena-Méndez A, et al. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Feb 13;9(2)

Existen múltiples iniciativas para reducir la **transmisión vectorial**, como la Iniciativa Cono sur (INCOSUR) para los países de Sudamérica, o las Iniciativas para los países andinos, México y Centro América o la cuenca del Amazonas, que tienen como objetivo la eliminación de los principales vectores de la enfermedad. Países como Uruguay (1997), Chile (1999) o la mayor parte del territorio de Brasil (2006) están libres de transmisión vectorial de la enfermedad (60).

Se considera que en América latina existen 15.000 casos nuevos de **infección congénita** por año con una tasa de transmisión del 5%, llegando hasta el 12% en zonas de alta prevalencia como Bolivia (61)(62).

En zonas no endémicas, la tasa de infección congénita es menor que en la zona endémica y es aproximadamente del 2.7% (62). Concretamente en Catalunya, la tasa detectada en los últimos años es algo mayor alcanzando el 4.17% (63).

INTRODUCCIÓN

Según datos de nuestro centro, la seroprevalencia de EC entre 1.473 gestantes fue del 35% con un único caso de transmisión congénita lo que supuso una tasa de transmisión del 5% (64).

Respecto a la prevención de la transmisión congénita, el tratamiento de las mujeres en edad fértil se considera la medida más eficaz (60). Este hecho incide en la necesidad de diagnosticar y tratar la EC de la forma más precoz posible haciendo mayor hincapié en mujeres jóvenes y en edad fértil (35)(65).

Con este objetivo, en España existen tres comunidades autónomas Catalunya, Comunidad Valenciana y Galicia, donde existe un protocolo de cribado de mujeres embarazadas (66)(67)(68). La realización del cribado en gestantes permite detectar precozmente casos de infección congénita, tratar a la gestante en el período post-parto así como permitir el acceso al cribado a otros hijos e incluso el resto de la familia. En Catalunya el programa de cribado existe desde el año 2011 con un aumento de la tasa de cumplimiento desde el 68.4% en 2010 hasta el 88.6% en 2015 (63)(69).

En las últimas décadas se han descrito entre 300 y 800 casos de infección por *T.cruzi* a partir de distintos tipos de **hemoderivados** (37). En nuestro medio, la prevalencia de donantes seropositivos fue del 0.62% según datos recogidos en un estudio realizado en el Banco de Sangre de Catalunya (70).

En España desde el año 2005 existe un Real Decreto (Real Decreto 1088/2005) por el cual es obligatorio cribar la EC en todos los donantes con factores de riesgo epidemiológicos de padecer la enfermedad. Los programas de cribado serológico en los bancos de sangre han permitido reducir de forma drástica esta vía de transmisión (70)(71).

En cuanto al control de la **transmisión por donación de órganos**, como ya se ha comentado, se debe realizar un cribado serológico a todos los potenciales donantes de precursores hematopoyéticos y órgano sólido con factores de riesgo epidemiológico de

INTRODUCCIÓN

padecer la EC. Para ello existen recomendaciones tanto a nivel nacional como internacional (39)(46)(72).

En cuanto a receptores de órganos, se estima una prevalencia de EC entre receptores de órganos entre 0 y 10.7%, siendo del 7.1% en una cohorte de 49 receptores con criterios epidemiológicos compatibles seguida en nuestro hospital (42). El riesgo de reactivación de la enfermedad debida a la inmunosupresión justifica el cribado en receptores con criterios epidemiológicos compatibles y el tratamiento y estrecha monitorización post-trasplante en los casos positivos (41)(43). En nuestro país se han descrito formas graves de reactivación por EC en receptores de trasplantes en los que no se había realizado cribado previo (73).

Por último, al contrario a lo que ocurre con el resto de vías de transmisión, en los últimos años se ha visto incrementado el número de brotes y afectados por **transmisión oral**. En algunos territorios como la cuenca del Amazonas se han convertido en una importante vía de transmisión (3).

Con el objetivo de diagnosticar y tratar el mayor número de casos posibles, la detección de *T.cruzi* está incluida en la mayor parte de recomendaciones de **cribado de enfermedades infecciosas** en inmigrantes asintomáticos (74)(75).

A esto hay que añadir que es una maniobra coste-efectiva particularmente importante en niños, adolescentes, mujeres embarazadas y mujeres en edad fértil ya que es la medida preventiva más eficaz frente a la transmisión congénita (76). El 10% de la carga económica que supone la EC a nivel mundial corresponde a países no endémicos (53).

A pesar de todo ello, debido a que la mayoría de casos son asintomáticos, a la falta de conocimiento de la enfermedad entre el personal sanitario y en muchas ocasiones a la dificultad en el acceso al sistema sanitario, así como condicionantes culturales y sociales por parte de la población susceptible, el infradiagnóstico de la EC en Europa llega hasta un 94-96% (77). Es necesaria la formación del personal sanitario en el

manejo de esta enfermedad y la implicación de los Servicios de Salud Pública para potenciar e intentar unificar políticas de control de la infección a nivel europeo (78).

Además de los programas de cribado de EC ya mencionados en bancos de sangre, gestantes y donantes de órganos, existen otros protocolos específicos para pacientes susceptibles de reactivaciones como pacientes infectados por VIH o inmunosuprimidos (79)(80)

Con el objetivo de incrementar el número de diagnósticos, también existen actividades a nivel comunitario que pretenden llegar al mayor número de personas incluyendo aquellas que por diversas razones no llegan al sistema sanitario (81)(82).

1.3. Enfermedad de Chagas

1.3.1. Patogenia y Manifestaciones clínicas

La EC pasa por dos fases, una fase aguda que dura entre 4 y 8 semanas en la que existe una alta parasitemia, seguida de una fase crónica caracterizada por una parasitemia baja e intermitente que se prolonga durante años, incluso toda la vida del enfermo.

Fase aguda

La fase aguda se produce 7-10 días tras la introducción del parásito en el organismo. El daño en esta fase se produce directamente por la acción del parásito en los distintos tejidos (10). Generalmente en esta fase el paciente permanece asintomático. Si aparecen, los síntomas son inespecíficos generalmente se trata de un cuadro febril acompañado de adenopatías con o sin hepatoesplenomegalia y en un 90% de los casos se autolimitan (11). En ocasiones aparece una inflamación local en el punto de la piel por donde penetra el parásito llamado chagoma de inoculación. En el caso de que este chagoma se presente como una inflamación palpebral unilateral e indolora

secundaria a la inoculación a través de la conjuntiva se conoce como signo de Romana y es característico de esta fase de la enfermedad (10). En un pequeño porcentaje de casos (aprox 5-10%) pueden presentarse manifestaciones graves como la encefalitis o la miocarditis. Este porcentaje aumenta en casos de transmisión oral debido a la inoculación de una alta carga parasitaria presente en el alimento contaminado (83).

Fase crónica

En pacientes no tratados, la fase aguda de la enfermedad se sigue de la fase crónica. Los mecanismos patogénicos en esta fase no son bien conocidos pero se acepta que se trata de un proceso multifactorial (84). Existen múltiples estudios que demuestran que la presencia crónica del parásito provoca una reacción inflamatoria mantenida causante de la lesión crónica. Pero existen otros factores como una alteración en la respuesta inmune del hospedador frente al parásito o la UDT implicada que condiciona un histotropismo selectivo y la virulencia (85). A pesar de que los amastigotes de *T.cruzi* pueden estar presentes en múltiples células nucleadas, los tejidos más afectados en la fase crónica son el tejido cardíaco y digestivo.

La EC también es muy compleja desde el punto de vista inmunológico. En el control de la enfermedad, participan tanto la respuesta inmune innata como la adquirida de tipo Th1, en la que están implicados los linfocitos B y T, células natural killer y factores pro-inflamatorios y citocinas como el IFN- γ , el factor de necrosis tumoral α y la interleukina 12 (86). Mientras existe un equilibrio entre esta respuesta y la acción del parásito, el paciente permanece asintomático (87).

En la mayoría de pacientes en fase crónica (60-70%) se mantiene este equilibrio y por tanto permanecen asintomáticos durante años en lo que se conoce como **fase crónica indeterminada**. En el resto de pacientes (30-40%) aparecen las manifestaciones cardíacas, digestivas o ambas (10). El porcentaje de afectación visceral y la gravedad de las manifestaciones también depende de muchos factores propios del parásito,

INTRODUCCIÓN

principalmente la UDT, del hospedador e incluso de las pruebas complementarias realizadas para detectarlas. Existen diferencias entre las series realizadas en áreas endémicas y las no endémicas, en estas últimas los pacientes suelen ser más jóvenes y presentan menos complicaciones viscerales (88).

Las **manifestaciones cardíacas** son las mejor estudiadas (afectan 15-45% de los pacientes en fase crónica) y las que condicionan el pronóstico de la enfermedad. La cardiopatía chagásica generalmente presenta peor pronóstico que las cardiopatías idiopáticas o de otras etiologías (10). Se deben principalmente a alteraciones de la conducción y de la contractilidad del miocardio. Las primeras son secundarias a la presencia de nidos de amastigotes que dan lugar a fallos en la estimulación eléctrica del corazón. Estos fallos producen distintos grados de arritmias que se pueden manifestar como palpitaciones, síncope e incluso muerte súbita. El miocardio sufre una dilatación que da lugar a una miocardiopatía dilatada causante de insuficiencia cardíaca (89). El electrocardiograma y la ecocardiografía son las técnicas más indicadas para detectar las lesiones cardíacas en estadios precoces (90).

Las **manifestaciones digestivas** son menos frecuentes afectando aproximadamente al 20% de los pacientes crónicos. Las alteraciones digestivas también son debidas a una lesión del sistema nervioso entérico que derivan en trastornos motores que dan lugar a dilataciones importantes principalmente del esófago y el colon (megaesófago y megacolon). Estas lesiones se traducen en alteraciones de la deglución (dispepsia, disfagia, reflujo gastro-esofágico) y estreñimiento crónico respectivamente.

Las exploraciones complementarias más utilizadas para la evaluación de la alteración digestiva son las que permiten observar estas dilataciones (enema opaco) pero hay otras que evalúan su funcionalidad como la manometría esofágica que también han demostrado su utilidad (91)(92).

Las **reactivaciones de la fase crónica** de la EC, debidas a estados de inmunosupresión, presentan una alta parasitemia y manifestaciones clínicas que pueden ser graves tanto a nivel sistémico (meningitis, meningoencefalitis, miocarditis o

INTRODUCCIÓN

lesiones cutáneas) como local (chagoma) (93). Como ya se ha comentado, para evitar estas complicaciones, los pacientes con antecedentes epidemiológicos compatibles con la EC que están inmunodeprimidos deben ser cribados y posteriormente monitorizados de forma continuada para detectar posibles complicaciones de forma temprana.

1.3.2. Diagnóstico

El método diagnóstico de elección depende de la presencia del parásito en sangre y por tanto, de la fase de la enfermedad.

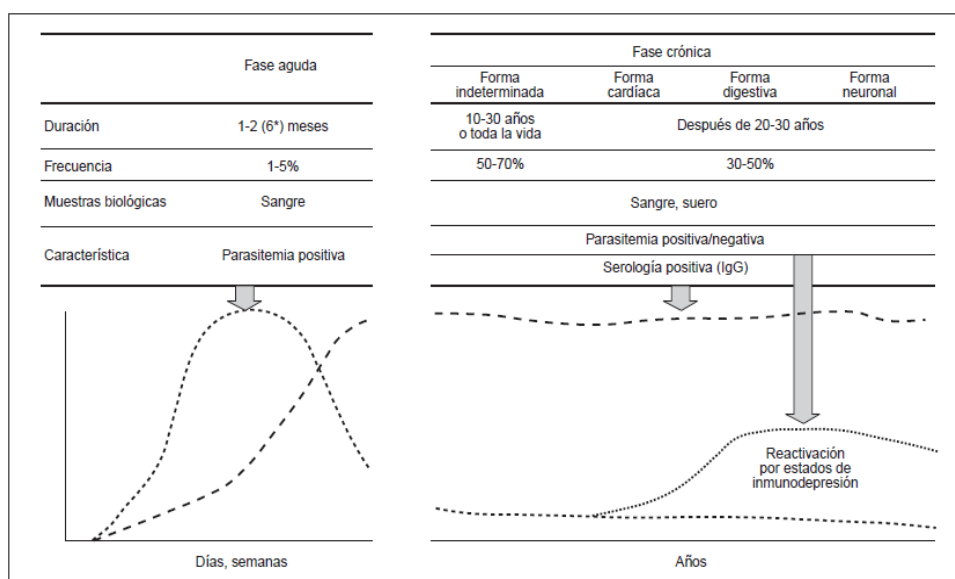


Figura 9. Comportamiento de la parasitemia (línea de puntos) y de la respuesta serológica (línea discontinua) en la EC. Fuente: Flores-Chavez et al. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:29–37.

En la fase aguda donde la parasitemia es alta, los métodos diagnósticos se basan en la detección del parásito en sangre periférica. Para ello se utilizan el examen microscópico que permite la visualización de los tripomastigotes circulantes, técnicas de amplificación biológica como el hemocultivo o el xenodiagnóstico, o técnicas moleculares como la PCR que permiten detectar su ADN.

En la fase crónica donde la parasitemia es más baja e intermitente, la sensibilidad de las técnicas parasitológicas disminuye drásticamente y el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T.cruzi*.

1.3.2.1. Diagnóstico parasitológico

Examen microscópico

El examen microscópico puede realizarse por observación directa de los tripomastigotes en una gota de sangre en fresco, o bien mediante extensión o gota gruesa teñida con la tinción de Giemsa.

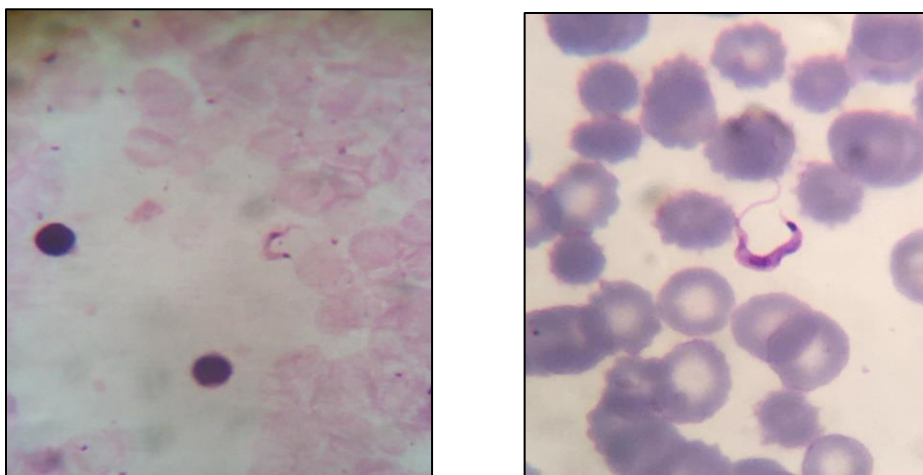


Figura 10. Imagen de tripomastigotes de *T.cruzi* en gota gruesa (izquierda) y extensión de sangre periférica (derecha). Fuente: imágenes propias cedidas por F. Zarzuela (Laboratorio Drassanes-Vall d'Hebron).

El examen microscópico directo presenta una sensibilidad entre 35% y 92% y varía en función del volumen de sangre utilizado (94). Sin embargo, las más utilizadas son las técnicas de concentración en las que se realiza una centrifugación con el objetivo de aumentar la sensibilidad, como ocurre con la técnica de Strout o triple centrifugación o el microhematocrito (95).

La técnica de Strout se basa en tres centrifugaciones a distintas velocidades para primero eliminar los hematíes residuales y posteriormente concentrar los parásitos. Esta técnica requiere de un importante volumen de sangre lo cual complica su uso en

recién nacidos quedando exclusivamente para el diagnóstico de personas adultas (96). Por su parte el microhematocrito, requiere una mínima cantidad de sangre que se recoge en un microcapilar. Tras la centrifugación, en la interfase entre los hematíes y el plasma se encuentra la capa leucocitaria en la que se pueden observar el movimiento característico de los parásitos (97). Debido a la dificultad de diferenciar parásitos vivos de restos de ADN mediante PCR, hay autores que todavía consideran que este es el método gold-standard en el diagnóstico de infección congénita (61).

Métodos de amplificación biológica

Los métodos de amplificación biológica permiten multiplicar el número de parásitos a partir de un determinado volumen de sangre, utilizando medios de cultivo (hemocultivo) o el propio redúvido (xenodiagnóstico).

El hemocultivo se realiza a partir de sangre contaminada en medios como el clásico Nicolle-Novy-MacNeal (NNN) o el liver infusión triptose (LIT), también utilizado para el cultivo de otros kinetoplastidos como *Leishmania* sp.

El xenodiagnóstico consiste en utilizar redúvidos naive que ingieren sangre de pacientes con tripomastigotes circulantes reproduciendo el ciclo en el vector. Al examinar las heces de ese redúvido se podrán observar los tripomastigotes metacíclicos.

La sensibilidad de ambas técnicas en fase aguda o reagudizaciones de la fase crónica oscila entre 0 a 94% en el caso del hemocultivo y entre el 9% y el 87,5% cuando hablamos del xenodiagnóstico (98). Ambas técnicas son lentas y requieren de una infraestructura compleja, por lo que no se utilizan en el diagnóstico clínico habitual y quedan relegadas a laboratorios de referencia.

La sensibilidad depende del volumen de sangre utilizado y de la parasitemia presente en el momento en que se recoge la muestra. Su sensibilidad disminuye de forma drástica cuando disminuye la parasitemia por lo que se desaconseja su uso en la fase crónica de la EC (99).

1.3.2.2. Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, estos se producen de forma estable y mantenida como parte de la respuesta humoral frente a la infección (100).

Actualmente, no hay una técnica que por sí sola alcance el 100% de sensibilidad y especificidad, por lo que el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, al menos, dos técnicas de distinto principio y antígeno (101).

Existen dos tipos distintos de técnicas serológicas en función del tipo de antígeno que utilizan. Por una parte las técnicas **convencionales** que utilizan antígeno nativo, generalmente lisado del parásito completo y las **no convencionales** que utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (99). El objetivo de utilizar dos técnicas diferentes es alcanzar la sensibilidad (test convencional) y especificidad (test no convencional) necesarias para diagnosticar el mayor número de casos.

El uso de los test convencionales que permiten detectar incluso niveles bajos de anticuerpos debido a su alta sensibilidad, presenta como inconveniente la obtención de resultados falsamente positivos generalmente secundarios a reacciones cruzadas con otros microorganismos relacionados como *Leishmania* sp o *Trypanosma rangeli* (102).

Los test no convencionales permiten aumentar la especificidad y reducir el número de falsos positivos a pesar de que su sensibilidad es variable y viene determinada por las fracciones antigénicas presentes en el test. La sensibilidad es mayor al aumentar el número de fracciones antigénicas y debe incluir las de diferentes UDT del parásito, lo cual tiene especial relevancia en zonas no endémicas donde los pacientes provienen de distintas áreas geográficas (103).

Las técnicas convencionales más utilizadas son la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (101). La mayor parte de test no convencionales se han diseñado en formato ELISA. Entre todas

INTRODUCCIÓN

estas técnicas, el ELISA debido a su buena sensibilidad, la posibilidad de automatización y una interpretación objetiva de los resultados es la técnica más adecuada para realizar el cribado serológico de la EC (104)(105).

En los últimos años se ha desarrollado una nueva tecnología absolutamente automatizada basada en la quimioluminiscencia. Actualmente existen tres plataformas en el mercado (CMIA ARCHITECT® Chagas Assay, CLIA LIAISON® XL murex Chagas y Elecsys® Chagas) que utilizan proteínas recombinantes con un elevado número de fracciones antigénicas lo cual le confiere unos excelentes resultados de sensibilidad y especificidad (106).

La alta sensibilidad que presentan estas técnicas ha hecho replantearse el actual algoritmo diagnóstico. Utilizando estas técnicas, el resultado negativo permitiría descartar el diagnóstico y un resultado positivo por encima de un determinado punto de corte, confirmarlo. Únicamente en el caso de obtener valores en una “zona gris” obligaría a realizar una técnica convencional para confirmar el resultado (107)(108).

La serología no es una buena técnica para el diagnóstico de la fase aguda ya que además del retraso de la respuesta humoral, la mayor parte de kits comerciales no incluyen la detección de IgM (100). Sin embargo, existen estudios en los cuales la detección de IgM ha resultado ser un buen marcador precoz de infección congénita (109).

La monitorización de la respuesta al tratamiento mediante técnicas serológicas es poco eficaz a corto plazo debido a que es una respuesta muy lenta que requiere largos seguimientos (110)(111). La tendencia lineal a la disminución de los anticuerpos así como el diseño de nuevos kits utilizando péptidos sintéticos para la realización del ELISA son estrategias utilizadas para mejorar y anticipar la respuesta serológica en pacientes tratados (112).

A pesar de todo ello, la pérdida de los anticuerpos sigue siendo el único criterio válido de curación de la EC.

Serología discordante y pruebas confirmatorias

La utilización de dos técnicas serológicas tal y como propone el algoritmo de la OMS puede dar lugar a resultados discordantes. En el caso de que se produzca esta discordancia, se debe repetir la determinación y en el caso de que se mantenga, en necesario realizar una tercera técnica de mayor especificidad que permita confirmar el diagnóstico (101). Los casos en los que no se pueda llegar a un diagnóstico definitivo, quedarán como no concluyentes. Estos casos generan un problema clínico, ya que la actitud clínica y terapéutica a seguir en estos casos no está bien definida, además de generar una importante inquietud en el paciente.

La prevalencia de resultados serodiscordantes se estima alrededor de un 2% en estudios realizados en bancos de sangre (113)(114)(115). En nuestra experiencia, utilizando para el diagnóstico dos ELISA en paralelo, este valor aumenta hasta el 3.3%. Al repetir la serología tras unos meses esta discordancia desaparece únicamente en el 28.4%, quedando el resto como casos no concluyentes (116).

Existen varias técnicas confirmatorias: TESA-blot, es un inmunoblot que utiliza antígenos de excreción-secreción de tripomastigote (117). Permite diferenciar IgM e IgG y presenta datos de sensibilidad y especificidad cercanos al 100%. Se considera una técnica confirmatoria especialmente útil en el diagnóstico definitivo de casos discordantes (118). En nuestra experiencia, tanto en casos discordantes como en inconclusos, la utilización del TESA-blot únicamente permitió establecer un diagnóstico definitivo en la mitad de los casos (116).

El Western blot in-house con tasas de sensibilidad y especificidad cercanas al 100% fuera del área endémica, pero es una técnica de gran complejidad en su realización e interpretación(119). En un estudio comparativo, el WB in-house permitió confirmar el diagnóstico en el 35.4% de los casos discordantes mientras que TESA-blot lo hizo en el 45.8% (120).

INTRODUCCIÓN

Existen otras técnicas como el ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA) de referencia en Estados Unidos, el ensayo en línea InnoLIA mucho más sencillo de utilizar o técnicas de neutralización que aunque son muy laboriosas presentan gran especificidad (106)(121)(122).

Todas estas técnicas presentan inconvenientes: son laboriosas y complejas, no están automatizadas y ninguna se comercializa actualmente en Europa. Todo ello dificulta su utilización en laboratorios de diagnóstico clínico, donde los casos repetidamente discordantes generalmente quedan como no concluyentes obligando a un seguimiento clínico prolongado en el tiempo.

La técnica de PCR se realiza con frecuencia en estos casos, ya que un resultado positivo permite confirmar el diagnóstico, sin embargo, un resultado negativo no lo excluye.

1.3.2.3. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos que permite la detección de ADN de *T.cruzi* en muestras de sangre periférica y tejidos.

Desde su inicio, en la década de los 90 del siglo XX, ha sido ampliamente utilizada debido a su alta sensibilidad en la detección de parasitemia respecto a los métodos parasitológicos convencionales (123)(124)(125).

Se utiliza fundamentalmente en el diagnóstico de casos con alta parasitemia como la fase aguda de la enfermedad: casos de infección congénita, transmisión oral o en receptores seronegativos de donantes seropositivos y en las reactivaciones de la fase crónica que ocurren en situaciones de inmunosupresión. Actualmente, otra de sus principales aplicaciones es la evaluación de la respuesta al tratamiento tripanocida (126).

INTRODUCCIÓN

A pesar de su indiscutible utilidad, la mayor desventaja de la PCR es no permitir diferenciar parásitos viables de ADN circulante, aunque en estudios in vitro sólo ha sido posible detectar ADN inyectado de forma experimental en ratones, durante aproximadamente dos días (127).

Existen múltiples protocolos de PCR con resultados de sensibilidad variables debidos a la implicación de múltiples factores: volumen de sangre utilizado, las condiciones de conservación de la muestra, el procedimiento de extracción de ADN, la diana de amplificación, el diseño de los cebadores o las condiciones del termociclador.

La utilización del tampón hidrocloreto de guanidina 6M pH8 (GEB) en el pre-tratamiento de la muestra de sangre permite homogeneizar la muestra y lisar el parásito aumentando la capacidad de detectar mínimas cantidades de ADN aumentando la sensibilidad de la técnica principalmente en casos de parasitemias bajas como ocurre en la fase crónica de la EC. El tampón GEB también permite la conservación de la muestra de sangre durante largos períodos de tiempo (128).

Debido a la gran heterogeneidad de protocolos y con el fin de evaluar la importancia de cada uno de estos factores, en 2011 se realizó un taller en Argentina en el que participaron los principales expertos en diagnóstico molecular de EC. Se valoraron hasta 48 protocolos de PCR diferentes, de los cuales sólo cuatro fueron elegidos por su sensibilidad y especificidad. Los mejores resultados se obtuvieron al amplificar secuencias ampliamente repetidas de ADN satélite presente en el núcleo (SatDNA) o del minicirculo del kinetoplasto (kDNA). Los mejores protocolos de PCR permitieron detectar al menos 10 fg/ml de ADN de *T. cruzi* o el equivalente a 0.5 parásitos/mL con una sensibilidad entre 83.3–94.4% y una especificidad de 85–95%. La sensibilidad de PCR que amplifican kDNA es mayor que la de satDNA (0.05–0.5 ps/ mL vs $5 \cdot 10^{-3}$ ps/mL) mientras que esta última presenta una mayor especificidad (129).

El número de copias de la diana de ADN a amplificar varía en función del parásito. TcI presenta una variación de 5 a 10 veces copias menos que el resto de linajes, lo cual condiciona menor sensibilidad de la PCR.

INTRODUCCIÓN

La implementación de ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) utilizando sondas fluorescentes como el Sybr Green o sondas específicas tipo TaqMan ha supuesto un avance importante en la implementación de estas técnicas en los laboratorios clínicos, ya que permite realizar la amplificación y la detección en el mismo paso, disminuyendo el riesgo de contaminaciones y facilitando el procesamiento técnico (130). La qPCR permite cuantificar la carga parasitaria y la utilización de protocolos multiplex en los cuales se puede incluir además de la sonda específica de *T.cruzi* un control interno que permita monitorizar la técnica (131).

El límite de detección de qPCR es de 0.1 a 0.01 ps/ml, teniendo en cuenta la diferencia en el número de copias de TcI respecto al resto de linajes, la carga parasitaria puede variar en pacientes infectados por esta UDT.

Los protocolos de qPCR han sido estandarizados con el objetivo de conseguir una correcta cuantificación en muestras de sangre con la menor variabilidad posible inter e intralaboratorio (132)(133).

Además, para garantizar la calidad de los datos de laboratorio, recientemente se ha diseñado e implementado un sistema de Control de calidad externo (CCE) (134).

Con el objetivo de mejorar la sensibilidad de qPCR, en los últimos años se han propuesto distintas estrategias: el uso de un qPCR multiplex que permita amplificar simultáneamente satDNA y kDNA, el aumento del número de réplicas de PCR bien aumentando el número de extracciones de ADN, bien el número de amplificaciones o ambas (135)(136). La posibilidad de automatizar en plataformas que incluyan la extracción del ADN o el uso de kits comerciales estandarizados son estrategias futuras que permitirán facilitar el uso de esta tecnología y permitirá obtener resultados robustos y de calidad (137).

Además del diagnóstico y seguimiento de pacientes con EC, las técnicas de PCR también se utilizan para la caracterización molecular de las distintas UDT. Para ello se utilizan algoritmos secuenciales que permiten la amplificación de distintos genes diferenciales de las distintas UDT (126)(138).

Además de la PCR, existen otras técnicas de amplificación molecular como la amplificación isotérmica de ADN mediada por asas (LAMP) basada en la amplificación de una importante cantidad de ADN usando una enzima termoestable que no requiere del uso de termociclador (139). Técnicamente es más sencilla, todo el proceso dura aproximadamente 40 minutos y se lee de forma visual. La facilidad técnica y la posibilidad de no requerir infraestructura ni aparataje especiales, es una técnica idónea para su implementación en zonas remotas (140). Existen incluso kits preparados para poder realizar LAMP con muy buenos resultados de sensibilidad y especificidad (141).

1.3.3. Tratamiento

Durante más de 40 años, los dos únicos fármacos utilizados para el tratamiento de la EC han sido dos compuestos nitroheterocíclicos: Benznidazol (BZL) y Nifurtimox (NFX).

La indicación de tratamiento con uno de estos dos fármacos está muy bien establecida en la fase aguda, en situaciones de reactivación en pacientes inmunosuprimidos, niños menores de 18 años y mujeres en edad fértil (101). Sin embargo, la indicación de tratamiento en fase crónica es controvertido. En un primer momento no se recomendaba porque se adjudicaba el daño tisular en fase crónica exclusivamente a una alteración de la respuesta inmune. Posteriormente, distintos estudios demostraron la presencia del parásito en los tejidos afectados de forma crónica, lo cual produjo un cambio de actitud, apoyándose en la hipótesis que el tratamiento retrasa la aparición de alteraciones cardíacas (85)(142). Sin embargo, existen resultados contradictorios respecto al efecto beneficioso del tratamiento en la progresión de la cardiopatía. Los resultados del estudio BENEFIT realizado en pacientes con cardiopatía chagásica no demuestran que los pacientes tratados tengan mejor evolución de la enfermedad cardíaca que los no tratados (143). Sin embargo, en un estudio realizado en Brasil en

INTRODUCCIÓN

2018 donde se evaluaron casi 2.000 pacientes con alteraciones electrocardiográficas, a los dos años de seguimiento tanto la mortalidad como los marcadores de progresión de cardiopatía eran menores en el grupo de pacientes tratados que en no tratados (144). A pesar de esta controversia, el tratamiento suele ofrecerse a todos los pacientes en fase crónica menores de 55 años y sin cardiopatía avanzada (101). En nuestro medio el fármaco más utilizado es el BZL con una pauta de administración de 5 mg/Kg/día repartido en 2-3 tomas diarias durante 60 días.

La eficacia del tratamiento depende de varios factores como la edad, los antecedentes genéticos del paciente, la fase de la enfermedad o el linaje de *T.cruzi*. Las características farmacocinéticas y farmacodinámicas del medicamento así como la mayor o menor sensibilidad del biomarcador utilizado para medir la curación o el fracaso del tratamiento, a pesar de no afectar directamente a la eficacia de la droga influyen directamente en los resultados obtenidos (145).

El linaje del parásito influye directamente en la susceptibilidad de la cepa y marca la diferencia de porcentajes de curación en distintas series realizadas en regiones geográficas diferentes (16)(146)(147)(148). Se conocen cepas in vitro naturalmente resistentes a los dos fármacos conocidos lo cual puede explicar el elevado porcentaje de fracasos de tratamiento, aunque esto no ha podido demostrarse clínicamente (27).

Numerosos ensayos clínicos han informado hasta un 80% de cura parasitológica en la fase aguda y una cura del 60-70% en niños de hasta 14 años mientras que en fase crónica la eficacia disminuye hasta el 5-40% (149)(150)(151)(152)(153)(154).

BZL presenta un amplio espectro importante de efectos secundarios y puede requerir suspender el tratamiento en un 7-30% de los pacientes. Los efectos más frecuentes son reacciones de hipersensibilidad y toxicodermia, alteraciones gastrointestinales, cefalea, mialgias y excepcionalmente manifestaciones más graves como alteraciones hepáticas o neuropatía periférica (155).

Una de las principales preocupaciones en el seguimiento de los pacientes tratados es la ausencia de un biomarcador de curación precoz. La negativización de las pruebas

INTRODUCCIÓN

serológicas es el criterio actual de curación de la EC, pero la disminución de anticuerpos es lenta y requiere un seguimiento prolongado (156). Por otro lado, la negativización de las pruebas parasitológicas en sangre periférica, hemocultivo, xenodiagnóstico, incluida la PCR no aseguran la ausencia de infección. De hecho, un resultado negativo no puede tomarse como criterio de cura, mientras que un resultado positivo es un marcador útil del fracaso del tratamiento. Debido a su mejor accesibilidad en comparación con otras pruebas parasitológicas, la PCR es la mejor técnica para la detección temprana del fracaso del tratamiento reduciendo el tiempo de seguimiento (157). Actualmente, la PCR en tiempo real (qPCR) es el biomarcador más útil para evaluar las respuestas al tratamiento tripanocida (158)

1.3.4. Ensayos clínicos

En los últimos años se han realizado importantes esfuerzos para desarrollar nuevos fármacos que sustituyan a BZL y NFX.

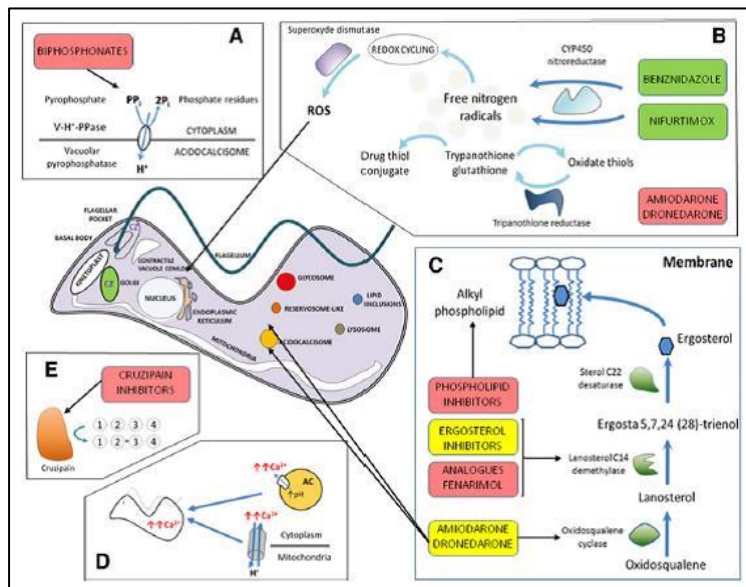


Figura 11. Mecanismos de acción de los fármacos con actividad tripanocida. Fuente: Sales Junior et al. Am J Trop Med Hyg 97 (5), 2017. 1289-1303

INTRODUCCIÓN

Para evaluar la eficacia y tolerabilidad de nuevos fármacos y pautas de tratamiento a lo largo del tiempo se han diseñado varios ensayos clínicos aleatorizados con o sin placebo (159)(160)(161). Uno de los retos más importantes en estos ensayos es disponer de un marcador de curación precoz que permita evaluar la eficacia de los nuevos tratamientos y en la mayoría de ellos la qPCR es el más utilizado.

Actualmente sólo BZL, NFX y los inhibidores de la síntesis de ergosterol (itraconazol, posaconazol o pro-ravuconazol (E-1224) han sido las drogas evaluadas en ensayos clínicos randomizados (162).

Existen otros estudios en los que se han incluido drogas como la amiodarona, un antiarrítmico conocido con cierta acción tripanocida como el alopurinol, el selenio o nuevos nitroimidazoles como el Fexinidazol (152).

En la actualidad y debido al fracaso de los inhibidores del ergosterol, se han comenzado ensayos para evaluar nuevos esquemas de benznidazol (Multibenz, BENDITA) y Nifurtimox (CHICOstudy) basados en estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos que indican que una disminución de la dosis o del tiempo de tratamiento permitirían mantener la eficacia del fármaco disminuyendo los efectos adversos (163).

Por último existe un importante número de nuevos fármacos que están en fase experimental pero con resultados prometedores, como los que interfieren en el metabolismo del parásito, otros inhibidores del ergosterol como albaconazol o voriconazol e incluso nuevas formulaciones de BZL(152).

En la tabla siguiente se sintetizan los diferentes ensayos clínicos en los que la qPCR ha sido el marcador utilizado para valorar la eficacia de las nuevas pautas de tratamiento.

INTRODUCCIÓN

	Clinical trial	Patients	Trypanocidal drug	PCR protocol	PCR pre-treatment	Parasitological Outcomes	EQA program
Galvao et al.2003	Randomized, double-blind, placebo-controlled	-111 children 7-12 years -Brasil	-Benznidazole (7-5 mg/kg daily/60 d) -Placebo	PCR+ hybridization - kDNA - Single result: One extraction + one amplification	Yes, both positive and undetectable	Conversion rates of <i>T.cruzi</i> DNA in peripheral blood at 3 years follow up	No
BENEFIT Morillo et al. 2015	International multicenter, randomized, double-blind and placebo-controlled	-2854 Chronic Chagas cardiomyopathy -Adult -Argentina, Bolivia, Brazil, Colombia, and El Salvador	-Benznidazole (5 mg per kg daily/60d)was modified on the basis of the patient's weight, thereby preserving the total dose -Placebo	-PCR - kDNA -Single result: One extraction+one amplification	Yes, both positive and undetectable	Conversion rates of <i>T.cruzi</i> DNA in peripheral blood at the end of treatment, 2, 5 of more years follow up	No
TRAENA Riarte et al. unpublished	Randomized, double-blind and placebo-controlled	-Symptomatic and asymptomatic chronic Chagas disease. -Argentina	-Benznidazole -Placebo	-qPCR - SatDNA - TaqMan dúplex qPCR	Yes, both positive and undetectable	Significant reduction of parasitic load at 12-24 months after treatment	No
STOP-Chagas Morillo et al. 2017	Prospective, multicenter randomized placebo-controlled	-120 Asymptomatic Chagas disease -Argentina, Chile, Spain,Colombia, Guatemala, and Mexico	- Posaconazole 400 mg b.i.d./60d - Benznidazole 200 mg + placebo b.i.d./60d - Benznidazole 200 mg + posaconazole 400 mg b.i.d./60d -Placebo 10 mg b.i.d./60d	-Real time PCR -kDNA -12 PCR result: each DNA sample was analyzed 3 times with 3 PCR, with 4 technical replicates	Yes, all positive	Conversion rates of <i>T.cruzi</i> DNA in peripheral blood at the end of treatment, 90, 120, 150, 180, and 360 days) days follow up	No
CHAGAS AZOL Molina et al. 2014	Prospective, randomized NOT placebo controlled	-78 symptomatic and asymptomatic chronic Chagas disease. -Spain (mainly bolivian)	-Benznidazole 150 mg b.i.d./60d -High-dose Posaconazole 400 mg b.i.d./60d -Low-dose Posaconazole 100 mg b.i.d./60d	- Real time PCR - satDNA - Two PCR results: One DNA extraction+2 amplification	Yes, all positive	Conversion rates of <i>T.cruzi</i> DNA in peripheral blood at the end of treatment, 4, 6 and 12 months follow up	Yes
E-1224 Torrico et al, 2018	Proof-of-concept, double-blind, randomized	-231 symptomatic and asymptomatic chronic Chagas disease. -Bolivia	-High-dose (4000 mg/8w) -Low-dose (2000 mg/8w) -Short-dose E1224 (2400mg/4w + placebo/4w). -Benznidazole (5 mg/kg per day/60d) -Placebo (8 w).	-q PCR - satDNA - Nine PCR results: Three DNA extraction+ three amplification for each one	Yes, all positive	Conversion rates of <i>T.cruzi</i> DNA in peripheral blood at the end of treatment, 4, 6 and 12 months follow up	Yes
1 qPCR: real time quantitative DNA. kDNA: kinetoplastid DNA. satDNA: satellite DNA. EQA: 2 External Quality Assurance Program 4 b.i.d.: twice a day. d: days. w: weeks							

Tabla 3. Ensayos clínicos monitorizados mediante qPCR. Fuente: Sulleiro et al. Acta Trop. 2019 Jul 31:105120

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Las técnicas moleculares, y en concreto la reacción en cadena de la polimerasa, presentan una gran sensibilidad en situaciones de alta parasitemia como la fase aguda o las reactivaciones de la fase crónica de la Enfermedad de Chagas.

Por el contrario, en la fase crónica caracterizada por una parasitemia baja e intermitente, la sensibilidad de la PCR es muy variable y un resultado negativo no permite descartar la infección, limitando su utilidad como técnica diagnóstica.

A pesar de la mejora de los protocolos de PCR, principalmente a partir de la introducción de la PCR a tiempo real, existen múltiples factores tanto del parásito, como del hospedador e incluso geográficos y ambientales, que afectan a la presencia de *T.cruzi* en sangre periférica durante la fase crónica y por tanto a la capacidad de detección de su ADN.

Sin embargo, la realización de la PCR en pacientes no tratados nos puede permitir conocer aspectos del comportamiento del parásito en esta fase de la enfermedad y analizar posibles factores que condicionan su presencia en sangre periférica.

En pacientes que han recibido tratamiento tripanocida, un resultado positivo de PCR es el mejor y más precoz marcador de fracaso terapéutico. Actualmente la mayor utilidad de la PCR en fase crónica radica en el seguimiento de los pacientes tratados y la monitorización de la eficacia de nuevas pautas de tratamiento en el contexto de distintos ensayos clínicos.

JUSTIFICACIÓN

HIPÓTESIS

HIPOTESIS

3. HIPÓTESIS

Aunque la PCR a tiempo real no ha demostrado su utilidad para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en fase crónica, la detección de ADN de *T. cruzi* obtenidos mediante esta técnica en pacientes no tratados pueden aportar datos sobre el comportamiento del parásito. Por otra parte, la qPCR puede ser útil en la monitorización de la respuesta al tratamiento en el seguimiento de los pacientes.

HIPOTESIS

OBJETIVOS

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal:

El **objetivo principal** de esta tesis es evaluar la utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real en el diagnóstico y seguimiento de pacientes en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas en un área no endémica.

4.2. Objetivos específicos:

1.- Describir las aportaciones de la realización de la qPCR en pacientes con EC crónica en ausencia de tratamiento. Analizar su utilidad en el diagnóstico y relación con la aparición de alteraciones viscerales.

2.- Describir las aportaciones de la realización de la qPCR de forma seriada en pacientes con EC crónica en ausencia de tratamiento. Valorar posibles factores que influyen en el comportamiento del parásito y su presencia en sangre periférica.

3.- Describir la respuesta terapéutica a benznidazol en función del número de pacientes en los que se ha detectado parasitemia post-tratamiento mediante qPCR. Analizar la utilidad de la qPCR como marcador de fracaso terapéutico de pacientes con EC crónica tratados con este fármaco.

4.- Analizar la utilidad de la qPCR en la monitorización de pacientes con EC crónica tratados con benznidazol y posaconazol en el contexto del ensayo clínico Chagasazol.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Diseño y población de estudio

Todos los pacientes incluidos fueron visitados en las dos unidades de Salud Internacional pertenecientes al Programa de Salud Internacional del Institut Català de la Salut (PROSICS): la Unidad de Medicina Tropical y Salud Internacional del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y la Unidad de Medicina Tropical y Salud Internacional Vall d'Hebrón-Drassanes.

El diagnóstico microbiológico, tanto serológico como molecular de la EC, se realizó en la Unidad de Parasitología y Diagnóstico de Infecciones Importadas del Servicio de Microbiología del Hospital Vall d'Hebrón (Barcelona).

5.1.1. Aportaciones de la PCR a tiempo real en la fase crónica de la enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento

Los datos de pacientes con EC en fase crónica a los que se realizó qPCR en ausencia de tratamiento forman parte de un estudio observacional retrospectivo realizado entre Junio 2010 y Mayo de 2012.

Todos los pacientes cumplían los siguientes CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante dos técnicas serológicas realizadas en paralelo
- Edad superior a 18 años

Se EXCLUYERON:

- Gestantes
- Pacientes con cardiopatía severa
- Inmunosupresión.
- Tratamiento tripanocida previo.

Se recogieron las siguientes variables clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de todos los pacientes incluidos:

- Sexo
- Edad
- País de origen
- Alteración visceral: cardíaca, digestiva o mixta
- Tiempo de residencia fuera del área endémica
- Resultado cualitativo de la qPCR

Para considerar complicaciones cardíacas y/o esofágicas debidas a la EC se utilizaron la clasificación de Kuschnir (164) y Rezende (165) respectivamente. Para ello, se realizaron las siguientes pruebas complementarias:

- Electrocardiograma
- Radiografía de tórax
- Esofagograma
- Enema opaco.

Subcohorte de seguimiento

Durante los años 2011 y 2012, debido a una rotura de existencias de BZL, un grupo de pacientes no pudieron acceder a la medicación. A 38 de estos pacientes se les ofreció participar en un estudio de seguimiento de la parasitemia mediante determinaciones seriadas de qPCR en ausencia de tratamiento.

El seguimiento de esta subcohorte tuvo una duración de un año con seguimiento periódicos mediante qPCR al inicio del estudio y a partir de ese momento cada dos meses. Todos los pacientes recibieron tratamiento con BZL una vez se pudo conseguir de nuevo el fármaco.

5.1.2. Utilidad de la PCR a tiempo real en el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Chagas crónica tratados con benznidazol

Los datos de pacientes con EC en fase crónica tratados con BZL a los que se realizó seguimiento mediante qPCR formaron parte de un estudio observacional retrospectivo en el que se incluyeron pacientes que fueron diagnosticados entre 2009 y 2016. El período de seguimiento se prolongó hasta diciembre de 2018.

Todos los pacientes cumplían los siguientes CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante dos técnicas serológicas realizadas en paralelo
- Edad superior a 18 años
- Tratamiento con BZL
- Realización de qPCR previa al inicio del tratamiento con BZL

Se EXCLUYERON:

- Gestantes
- Pacientes con cardiopatía severa
- Inmunosupresión.

Se recogieron las siguientes variables clínicas, epidemiológicas y microbiológicas de todos los pacientes incluidos:

- Sexo
- Edad
- País de origen
- Alteración visceral: cardíaca, digestiva o mixta
- Resultado cualitativo de la qPCR antes del tratamiento
- Resultado cualitativo de la qPCR durante el seguimiento
- Seguimiento serológico

Como ya se ha indicado en el subapartado anterior, se utilizaron la clasificación de Kuschnir y Rezende, utilizando las pruebas complementarias ya descritas, para detectar complicaciones viscerales debidas a la EC.

El tratamiento con BZL fue administrado en dosis de 5 mg/kg/día durante 60 días, divididas en tres dosis al día vía oral con un máximo de 300 mg/día.

CONSIDERACIONES:

- Todos los pacientes incluidos habían tomado al menos una dosis de BZL.
- A todos los pacientes incluidos se les realizó al menos una determinación de qPCR posterior al tratamiento.
- Se consideró qPCR de seguimiento todas aquellas realizadas como mínimo tras dos meses desde la finalización del tratamiento.
- Se consideró como **fracaso de tratamiento** con BZL cualquier valor positivo de qPCR durante el seguimiento.

5.1.3. Utilidad de la PCR a tiempo real como marcador de fracaso de tratamiento con benznidazol o posaconazol en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas: Estudio Chagasazol

El estudio CHAGASAZOL (ClinicalTrials.gov number, NCT01162967) es un ensayo clínico prospectivo, abierto y aleatorizado en el que se utilizó la qPCR para la monitorización de la eficacia del tratamiento (166). Los pacientes eran aleatorizados en proporción 1:1:1 en las tres ramas del estudio:

- Benznidazol: BZL 150mg dos veces al día vía oral durante 60 días
- Posaconazol dosis bajas: PSL 100 mg dos veces al día vía oral durante 60 días
- Posaconazol dosis altas: PSL 400 mg dos veces al día vía oral durante 60 días

Todos los pacientes cumplían los siguientes CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante dos técnicas serológicas diferentes realizadas en paralelo

- Edad superior a 18 años
- qPCR con resultado cualitativo POSITIVO previo al tratamiento

Fueron CRITERIOS DE EXCLUSION:

- Haber realizado tratamiento tripanocida previo
- Enfermedad hepática actual
- Viajes a zona endémica durante el protocolo de estudio
- Gestación
- Inmunosupresión
- Electrocardiograma alterado: prolongación del segmento QT
- Posibles interacciones farmacológicas

Diseño y cronograma del ensayo clínico

Después de la aleatorización 1: 1: 1 y la firma del consentimiento informado, los pacientes iniciaron el tratamiento en función de la rama del estudio en la que habían sido asignados.

Las visitas de control se programaron a los 7, 14, 28, 45 y 60 días después de comenzar el tratamiento. Durante el estudio se les realizaron las siguientes pruebas complementarias: anamnesis con especial hincapié en la adherencia al tratamiento y potenciales efectos secundarios, análisis de sangre que incluyen hemograma y estudio bioquímico general, qPCR y seguimiento serológico.

Después de completar el tratamiento, los pacientes fueron seguidos durante 40 semanas con monitorización mediante qPCR a las 8, 16, 24 y 40 semanas después del tratamiento.

Se realizó una curva farmacocinética de posaconazol en todos los pacientes el día 14 de tratamiento para valorar las concentraciones plasmáticas del fármaco.

Como en los subapartados anteriores se utilizaron la clasificación de Kuschnir y Rezende, utilizando las pruebas complementarias ya descritas además de la

ecocardiografía, para detectar complicaciones cardíacas y/o digestivas debidas a la EC.

El cronograma con las diferentes visitas del estudio y las pruebas complementarias correspondientes quedan detalladas en la siguiente tabla.

	0d	7d	14d	28d	45d	60d	4m	6m	8m	12m
Visita médica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Analítica	x	x	x	x		x				
qPCR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Serología	x								x	x
ECG	x	x	x	x	x	x				x
RX tórax	x									x
Ecocardiografía	x									
Estudio digestivo	x									

Tabla 4: Cronograma Ensayo clínico Chagasazol.

Utilidad de la qPCR en el ensayo clínico

La qPCR ha sido utilizada en el ensayo clínico tanto como **criterio de inclusión** como criterio de valoración final de la eficacia de las tres ramas de tratamiento.

Los casos se consideraron **fracasos del tratamiento** cuando al menos una prueba de qPCR fue positiva en cualquier momento durante el período de seguimiento.

El análisis de los resultados de eficacia basados en los resultados de qPCR se realizó de dos formas:

- Análisis por intención de tratamiento (ITT): incluye a todos los pacientes aleatorizados incluidos los casos perdidos durante el seguimiento y los abandonos debido a eventos adversos que fueron considerados fracasos del tratamiento.

- El análisis por protocolo (PP): incluye únicamente a los pacientes que completaron el tratamiento y el seguimiento, excluyendo a los pacientes perdidos durante el seguimiento.

5.2. Métodos serológicos

Siguiendo el algoritmo diagnóstico de la OMS para el diagnóstico de la EC en fase crónica se realizaron simultáneamente dos técnicas serológicas de antígeno diferente. Ambas eran técnicas de enzimoimmunoensayo (EIA) que se procesaron de forma automatizada primero en un equipo BEP III (Siemens. Germany) y posteriormente en un DS2 (Dy nex. Germany).

El EIA que utiliza antígeno recombinante cambió en distintos períodos de tiempo:

EIA Ag recombinante	Anticuerpos	Fracciones antigénicas	Período de tiempo
Bioelisa Chagas (Biokit. Lliçà d'Amunt, Spain)	IgG+IgM	TcD, TcE, PEP-2, TcLo1.2	2007-2008
Novagnost Chagas (Siemens, Marburg, Germany)	IgG	TcF	2008-2009
Bioelisa Chagas (Biokit. Lliçà d'Amunt, Spain)	IgG+IgM	TcD, TcE, PEP-2, TcLo1.2	2010-2015
CHAGAS ELISA (Vircell, Granada, Spain)	IgG+IgM	FRA, B13, MACH (TcD, TcE, PEP-2,SAPA)	2015-2018

Tabla 5: EIA antígeno recombinante utilizados durante el período de estudio

El EIA que utiliza antígeno nativo siempre fue el reactivo Ortho T.cruzi ELISA, (Johnson & Johnson, High Wycombe, United Kingdom). Este reactivo utiliza como antígeno el lisado del propio parásito.

Interpretación de los resultados:

- Se consideraron **positivas** las muestras reactivas por ambos métodos.

- Se consideraron **negativas** las muestras no reactivas por ambos métodos.
- Se consideraron **discordantes** las muestras con una de las dos técnicas reactiva y la otra no reactiva. En caso de resultados discordantes, se repitió la serología en una nueva muestra a los 4- 6 meses.
- Se consideraron **no concluyentes** los resultados repetidamente discordantes.

5.3. Métodos moleculares

Las muestras de sangre para qPCR fueron extraídas por venopunción en tubos que contenían EDTA como anticoagulante. Se aceptó cualquier volumen de sangre superior a 1 ml. Las muestras se diluyeron en una proporción 1:1 con tampón Hidroclorhídrico de guanidina 6M pH8 (Sigma Aldrich) durante un período entre 24 y 72 horas a temperatura ambiente y a 4°C hasta su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE ADN:

La extracción de ADN se realizó a partir de 200 µl eluyendo en 50 µl mediante un equipo automatizado basado en partículas de sílice (NucliSens easyMAG. Biomerieux. Francia). El procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las muestras fueron congeladas a -20°C hasta su procesamiento.

PROTOCOLO DE qPCR:

Se realizó un protocolo de qPCR basado en la amplificación de un fragmento de 166 pb del satADN de *T. cruzi*. En la misma reacción se incluía un reactivo comercial (TaqMan RNase P Control Reagents kit. Life Technologies) que permite amplificar el gen de la RNasa P humana y que se utilizó como control interno.

Todas las muestras se analizaron por duplicado.

Las secuencias de los cebadores Cruzi-1 (Fw) y Cruzi-2 (Rv) así como de la sonda Cruzi-3 (P) marcada con el fluoróforo FAM son:

Secuencia	
Cruzi-1 (Fw)	ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA
Cruzi-2 (Rv)	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA
Cruzi- 3 (P)	(FAM)CACACACTGGACACCAA(MGB)

Tabla 6: Secuencias cebadores y sonda qPCR *T.cruzi* utilizada en el estudio.

En todos los ciclos de qPCR se incluyeron dos muestras de resultado conocido, una positiva y otra negativa, que sirvieron de control externo de amplificación.

Durante el período de estudio hubo una modificación en el protocolo de qPCR:

- **Protocolo qPCR-1 (Período 2010- mayo 2013):** Se realizó el protocolo descrito por Piron et al en 2007(167). Se utilizaron 5µl de ADN extraído en un volumen final de 20 µL que incluía los siguientes componentes:

Reactivo	Volumen	Concentración
TaqMan Universal PCR Master Mix (Life technologies)	10 µL	1x
Cruzi-1 (Fw)	1.5 µL	750 nM
Cruzi-2 (Rv)	1.5 µL	750 nM
Cruzi- 3 (P)	1 µL	250 nM
TaqMan RNase P Control Reagents kit	1 µL	1X
DNA	5 µL	
TOTAL	20 µL	

Tabla 7: Mezcla de qPCR correspondiente al protocolo qPCR-1 realizado en el período entre 2010 y 2013.

- **Protocolo qPCR 2 (Período 2013-2018):** Se realizó una modificación del protocolo que incluía aumentar el volumen final de reacción a 25 µL

manteniendo el volumen de ADN extraído en 5 µL. El volumen y cantidades del resto de reactivos fueron modificados siguiendo el esquema siguiente:

Reactivo	Volumen	Concentración
QuantiTect Multiplex PCR kit (Qiagen)	12.5 µL	1x
Cruzi-1 (Fw)	1 µL	400 nM
Cruzi-2 (Rv)	1 µL	400 nM
Cruzi- 3 (P)	0.5 µL	100 nM
TaqMan RNase P Control Reagents kit	1 µL	1x
DNA	5 µL	
TOTAL	25 µL	

Tabla 8: Mezcla de qPCR correspondiente al protocolo qPCR-2 realizado en el período entre 2013 y 2018.

CONDICIONES DEL TERMOCICLADOR:

- **Protocolo qPCR 1:** Se utilizó un termociclador SmartCycler Real-Time PCR system (Cepheid, Sunnyvale, CA) con las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
50°C	2 minutos	1
95°C	10 minutos	
95°C	15 segundos	
58°C	1 minuto	45

Tabla 9: Condiciones del termociclador correspondientes al protocolo qPCR-1

- **Protocolo q PCR-2:** Se utilizó un termociclador CFX Real-Time PCR detection system (Bio-Rad, Hercules, CA) con las siguientes condiciones:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95	15 minutos	1
95	15 segundos	
58	1 minuto	45

Tabla 10: Condiciones del termociclador correspondientes al protocolo qPCR-2

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS:

- El resultado de qPCR se consideró **positivo** cuando los dos ciclos de amplificación (Ct) de *T.cruzi* < 40 y los del control interno estaban dentro de rango.
- El resultado de qPCR se consideró **negativo** cuando los dos ciclos de amplificación (Ct) de *T. cruzi* > 45 y los y los del control interno estaban dentro de rango.
- Si uno de los Ct de *T. cruzi* es < 40 y otro > 45, se repetía de nuevo la amplificación, considerando el resultado de qPCR positivo si al menos una de las cuatro amplificaciones era < 40 y siempre que el control interno estuviese dentro de rango.

5.4. Programa de control de calidad qPCR

Para validar los resultados de la qPCR, se incluyó la realización de un programa de calidad (CCE).

Este programa incluye el procesamiento en ciego de cuatro paneles preparados en un laboratorio externo (Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular-INGEBI- del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas- CONICET. Buenos Aires. Argentina).

Para la preparación de los paneles se utilizó sangre seronegativa contaminada con concentraciones de 1, 10 y 100 equivalentes parasitarios (par. eq.)/mL de epimastigotes procedente de cultivo de las cepas K98 (TcIa), Sylvio X10 CI1 (TcId), LL014-1-R1 CI1 (TcV) y CL-Brener (TcVI) así como de controles negativos. Después de contaminar la sangre, esta se mezcló con un volumen igual de GEB 6M EDTA 0.2 M buffer, pH 8.00. Los paneles se mantuvieron a temperatura ambiente y luego fueron almacenados a 4°C hasta su envío.

Una vez llegaron los paneles al laboratorio se mantuvieron a 4°C y se procesaron en paralelo a los del laboratorio de referencia. Los tres primeros paneles de calidad se procesaron siguiendo el protocolo de qPCR 1 (período 2007-2013) y el último siguiendo el segundo protocolo qPCR 2 (período 2013-2018).

Los resultados fueron enviados al laboratorio de INGEBI-CONICET donde fueron evaluados.

5.5. Métodos estadísticos

En el análisis estadístico, las variables cualitativas se presentaron en números absolutos y porcentaje mientras que para las variables cuantitativas se utilizaron la media y la desviación estándar (DE) o la mediana y el rango intercuartílico (RIC) dependiendo de la distribución. El test de Kolmogorov-Smirnov se utilizó para evaluar la distribución normal de las variables.

Para comparar variables cualitativas se utilizó la prueba de χ^2 o el test exacto de Fisher y la prueba T de Student para variables cuantitativas. Se realizó un modelo de regresión logística univariante para evaluar la asociación de diferentes variables utilizando el paquete informático SPSS® para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si el valor de *P* era <0,05.

En el caso concreto del ensayo clínico Chagasazol, el valor de *P* al comparar las diferencias en la proporción de positividad de qPCR entre las tres ramas del estudio se ajustó utilizando el método de ajustes de Holm y el tiempo de positividad de la qPCR fue analizado mediante métodos apropiados para datos censurados. El análisis fue realizado con los paquetes estadísticos SAS® 9.2 (SAS Inst., Cary, NC) y R statistics.

5.6. Consideraciones éticas

Todos los datos obtenidos para la realización de esta tesis fueron aprobados por el Comité de ética del Hospital Vall d'Hebron:

- PR (AG) 48/2012 “Estudio de la cinética parasitaria de *Trypanosoma cruzi* mediante detección de DNA en sangre periférica por PCR”.
- Estudio Post Autorización código VHB-BEN-2014-01 “Utilidad de la técnica de PCR a tiempo real en el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Chagas tratados con benznidazol”.
- Ensayo clínico código TRA-201Chagasazol (ClinicalTrials.gov number, NCT01162967): Protocolo de ensayo clínico de fase II, aleatorizado y abierto para el tratamiento etiológico de la Enfermedad de Chagas crónica con posaconazol y benznidazol'.

Los procedimientos se realizaron siguiendo los códigos éticos establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos tras la revisión de 2013.

5.7. Fuentes de financiación y conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses respecto a los datos incluidos en esta tesis doctoral.

No ha existido financiación externa para la obtención de los resultados incluidos en esta tesis, excepto en el caso del ensayo clínico Chagasazol que fue financiado por el Instituto de Salud Carlos III del Ministerio Sanidad Servicios Sociales e Igualdad.

RESULTADOS

RESULTADOS

6. RESULTADOS

6.1. Aportaciones de la PCR a tiempo real en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento

Características clínico-epidemiológicas

Se realizó la qPCR a 495 pacientes diagnosticados de EC crónica que no habían recibido tratamiento entre 2010 y 2012.

De todos los pacientes, 328 (66.26%) eran mujeres y 167 (33.73%) hombres. Entre ellos, 480 (96.7%) eran de origen boliviano y sólo 15 (3.3%) procedían de otros países de Latinoamérica: 5 de Argentina, 4 Paraguay, 2 Brasil, 2 Ecuador, 1 Chile y 1 Venezuela.

La media de edad de los pacientes fue de 37.7 con un rango comprendido entre 19 y 68 años. Divididos por grupos de edad, 115 pacientes tenían edades comprendidas entre 18 y 30 años, 279 entre 31 y 45 años, 93 entre 46 y 59 años y por último sólo 8 de ellos eran mayores de 60 años.

De 463 pacientes se disponía de toda la información clínica para poder valorar si existía afectación visceral. En 325 (93.5%) de los pacientes no se pudo objetivar afectación orgánica y fueron clasificados en la fase indeterminada de la enfermedad. Por el contrario, 138 (27.9%) presentaban algún tipo de afectación visceral de los cuales 48 era de origen cardíaco, 79 presentaban alteraciones digestivas y 11 mixtas.

En 368 (74,3%) pacientes de los que se pudo recoger el dato de tiempo de residencia en España. Entre ellos, destaca que 153 (41.6%) hacía cinco años o menos desde que habían dejado el área endémica, por el contrario 215 (58.4%) hacía más de cinco años que residían en nuestro país.

La distribución de pacientes por años de residencia fuera del área endémica se observa en la figura 11.

RESULTADOS

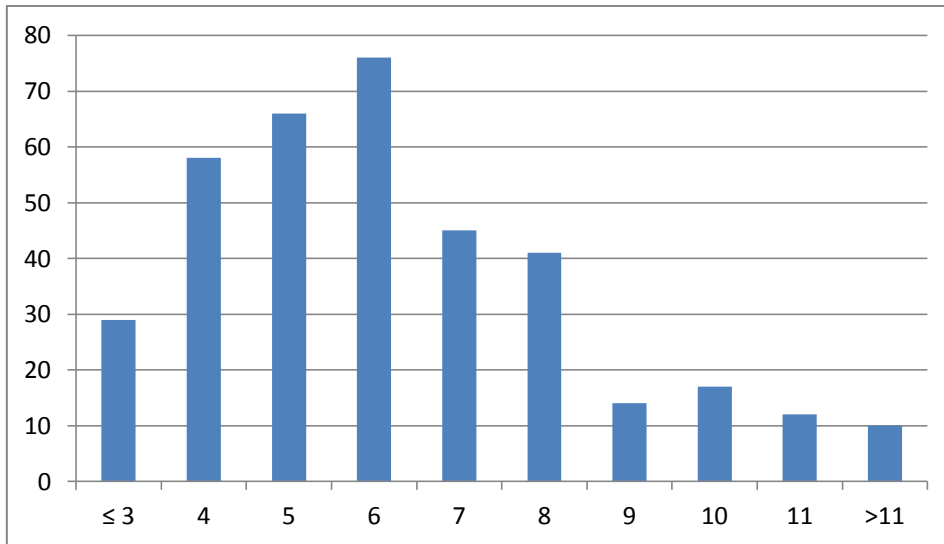


Figura 12. Distribución de pacientes por años de residencia en nuestro país

Resultados qPCR en una determinación puntual

La qPCR fue positiva en una única determinación puntual antes de iniciar tratamiento en 208 (42%) de los pacientes a los que se le realizó.

Entre los pacientes con parasitemia detectable el 64.4% eran mujeres y el 97.1% eran de Bolivia. El 56.7% tenían una edad comprendida entre 31 y 45 años, el 21.6% entre 18-30 años, 19.7% entre 46-59 años y 1.92% eran mayores de 60 años. Respecto a las alteraciones viscerales, el 11.1% de los pacientes parasitémicos presentaron afectación cardíaca y el 20.2% afectación digestiva.

No se detectó asociación estadísticamente significativa entre la presencia de ADN de *T.cruzi* y las distintas variables clínicas y epidemiológicas estudiadas, tal y como queda reflejado en la siguiente tabla:

RESULTADOS

Características	Pacientes qPCR positivo	P valor
Total (n=495)	208/495 (42%)	
Género (n = 495)		
Mujer	134/328 (41%)	0.461
Hombres	74/167 (44.3%)	
Edad (n = 495)		
18-30 años	45/115 (39.1 %)	0.791
31-45 años	118/279 (42,3 %)	
46-59 años	41/93 (44.1%)	
≥60 años	4/8 (50%)	
País de origen (n = 495)		
Bolivia	202/480 (42.1%)	0.872
Otros países *	6/15 (40%)	
Afectación cardíaca (n= 477)		
Afectación cardíaca	23/59 (39%)	0.706
Sin afectación cardíaca	176/418 (42.1%)	
Afectación digestiva (n= 467)		
Afectación digestiva	42/90 (46.7%)	0.379
Sin afectación digestiva	157/377 (41.6%)	

Tabla 11. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con parasitemia detectable

A pesar de ser una escala logarítmica, se utilizó el valor de los Ct como marcador indirecto de carga parasitaria. No se encontraron diferencias significativas entre el valor del Ct entre los pacientes que presentaron alteraciones viscerales y los que no (media \pm DE 37.02 \pm 2.6 vs 36.8 \pm 2.3. $P = 0.55$).

En cuanto a la relación entre la parasitemia y el tiempo de residencia fuera del área endémica, se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar el porcentaje de qPCR entre pacientes que residían menos tiempo fuera del área endémica (5 años o menos) respecto a los que llevaban más de 5 años en nuestro país: 74/153 (48.3%) vs 81/215 (37.7%), ($P = 0.041$).

RESULTADOS

Características	Pacientes qPCR positivo	P valor
Resultado qPCR desde su llegada a nuestro país (n = 368)		
≤ 5 años	4/153 (48.3%)	0.041
> 5 años	81/215 (37.7%)	

Tabla 12. Tiempo de residencia fuera del área endémica

Esta tendencia a la disminución de la parasitemia en función del tiempo de residencia queda reflejada en la siguiente figura.

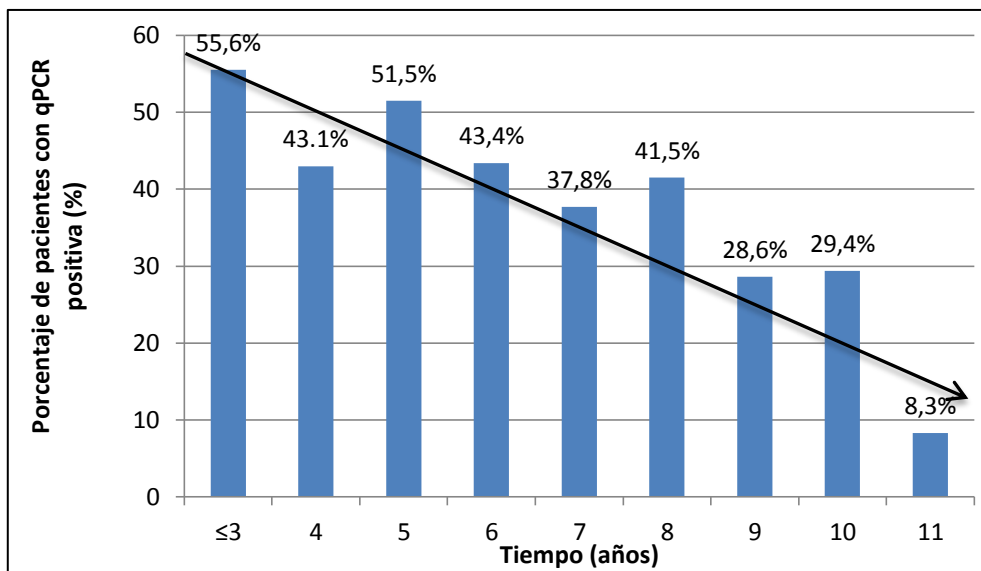


Figura 13. Porcentaje de pacientes con qPCR positiva distribuidos por años desde su llegada a nuestro país (n = 368 pacientes).

Subcohorte de seguimiento: resultados qPCR seriadas

De los 38 pacientes a los que se les pudo hacer seguimiento mediante qPCR, 24 eran mujeres y 14 hombres y el 97% de origen boliviano. Un paciente (2,6%) presentaba alteración cardíaca y 8 (21%) digestiva.

De todos los pacientes con determinaciones seriadas, 11 (29%) de ellos presentaron parasitemia de forma continuada y en otros tantos (11/38, 29%) no se detectó ADN de *T.cruzi* en ningún momento. En 16 (42%) la parasitemia se detectó de forma intermitente.

RESULTADOS

En 29 pacientes el seguimiento fue regular y fue de un mínimo de 8 meses de seguimiento. De estos, en 9 (31%) de los pacientes la parasitemia fue negativa de forma sostenida, 4 (17.2%) positiva y en 16 (51.8%) discontinua.

El resto de pacientes (9/38, 23.7%) hicieron un seguimiento irregular que no llegó a los 8 meses. Entre estos pacientes, en dos de ellos (22,2%) no se detectó parasitemia, uno realizó un seguimiento de dos meses y el segundo de 6. En seis pacientes (66,6%) la parasitemia fue mantenida, dos realizaron seguimiento únicamente durante dos meses, otros dos 4 meses y los dos restantes 6 meses. En un sólo caso (11%) la parasitemia fue intermitente con un seguimiento de 4 meses.

La cronología de los resultados de qPCR en el seguimiento de los pacientes con parasitemia intermitente aparece reflejada en la figura 13.

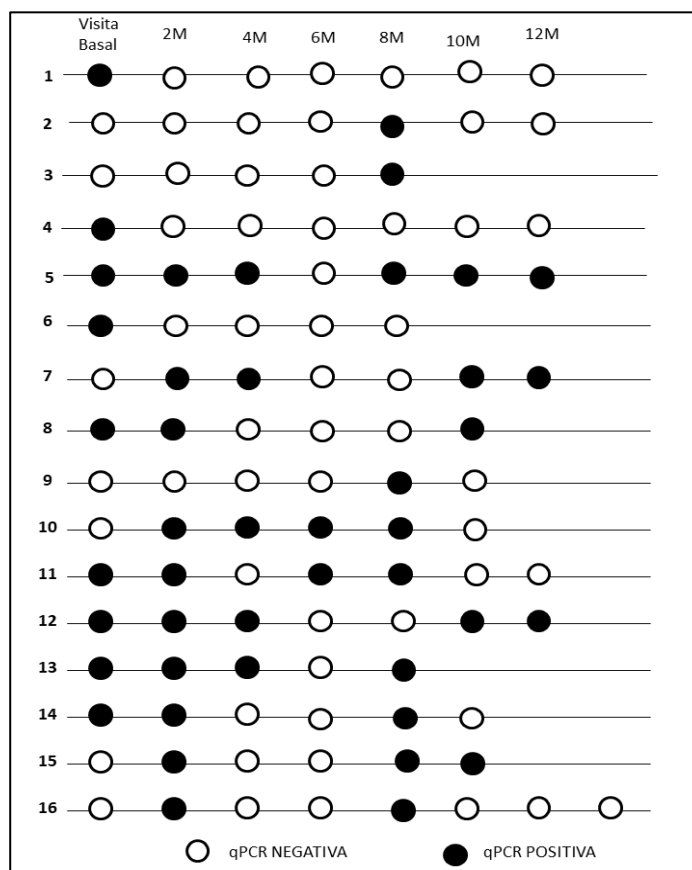


Figura 14. Seguimiento de pacientes con parasitemia intermite

RESULTADOS

Al valorar el tiempo de residencia en España de los pacientes incluidos en esta subcohorte de seguimiento, 12 de ellos (12/38, 31.6%) llevaban 5 años o menos fuera del área endémica. De ellos, 4 (33.3%) presentaron una parasitemia mantenida, 2 (16.6%) negativa y 6 (50%) intermitente.

Por el contrario, 26 de ellos (26/38, 68.42%) llevaban más de cinco años fuera del área endémica. De este último grupo, 6 (23%) pacientes presentaron parasitemia sostenida, 9 (34.7%) negativa y 11 (42.3%) intermitente.

A pesar de que entre los pacientes que llevaban más tiempo fuera del área endémica, 20/26 presentaran parasitemia negativa o intermitente, mientras que sólo 6/26 fuera positiva, la diferencia no fue significativa ($P=0.51$).

6.2. Utilidad de la PCR a tiempo real en el seguimiento de pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica tratados con benznidazol.

Características clínico-epidemiológicas

La respuesta al tratamiento con BZL fue monitorizada mediante qPCR en un total de 370 pacientes con EC crónica.

El 70% de esos pacientes (258/370) eran mujeres, y el 95.4% (268/281) provenían de Bolivia. Cuarenta y ocho pacientes (48/280, 17%) presentaron afectación gastrointestinal, 21% (67/318) pacientes tenían una lesión cardíaca y 7% (19/272) presentaban afectación mixta cardíaca y digestiva.

Monitorización del tratamiento mediante qPCR

Se realizó qPCR en todos los pacientes previamente al inicio del tratamiento resultando positiva en el 39,7% (147/370) de los casos.

La mediana del tiempo de seguimiento tras el tratamiento fue de 4 años (RIC 2.2-5.3) y la mediana de vistas fue de 3 (RIC 2-4) por paciente.

Con respecto al tiempo de seguimiento, los pacientes se dividieron en dos grupos:

RESULTADOS

- Corto plazo (<4 años): Se visitaron 171 (46,2%) pacientes que tuvieron una mediana de dos visitas (RIC 1-3), con una mediana de tiempo de seguimiento de 2.15 años (RIC 1.18-3.10).
- Largo plazo (≥4 años): Se visitaron 199 (53.8%) pacientes tuvieron una mediana de 4 visitas (RIC 3-5), con una mediana de tiempo de seguimiento de 5.2 años (RIC 4.5-7.14)

El tratamiento completo con BZL se logró en el 84% (300/357) de los pacientes. La causa principal de la interrupción del tratamiento fueron los síntomas cutáneos.

De todos los pacientes incluidos, únicamente 8 de ellos (2,2%) se consideraron como fracaso del tratamiento al presentar al menos un resultado de qPCR positivo durante el seguimiento. Un diagrama de flujo de los pacientes incluidos se muestra en la figura 14.

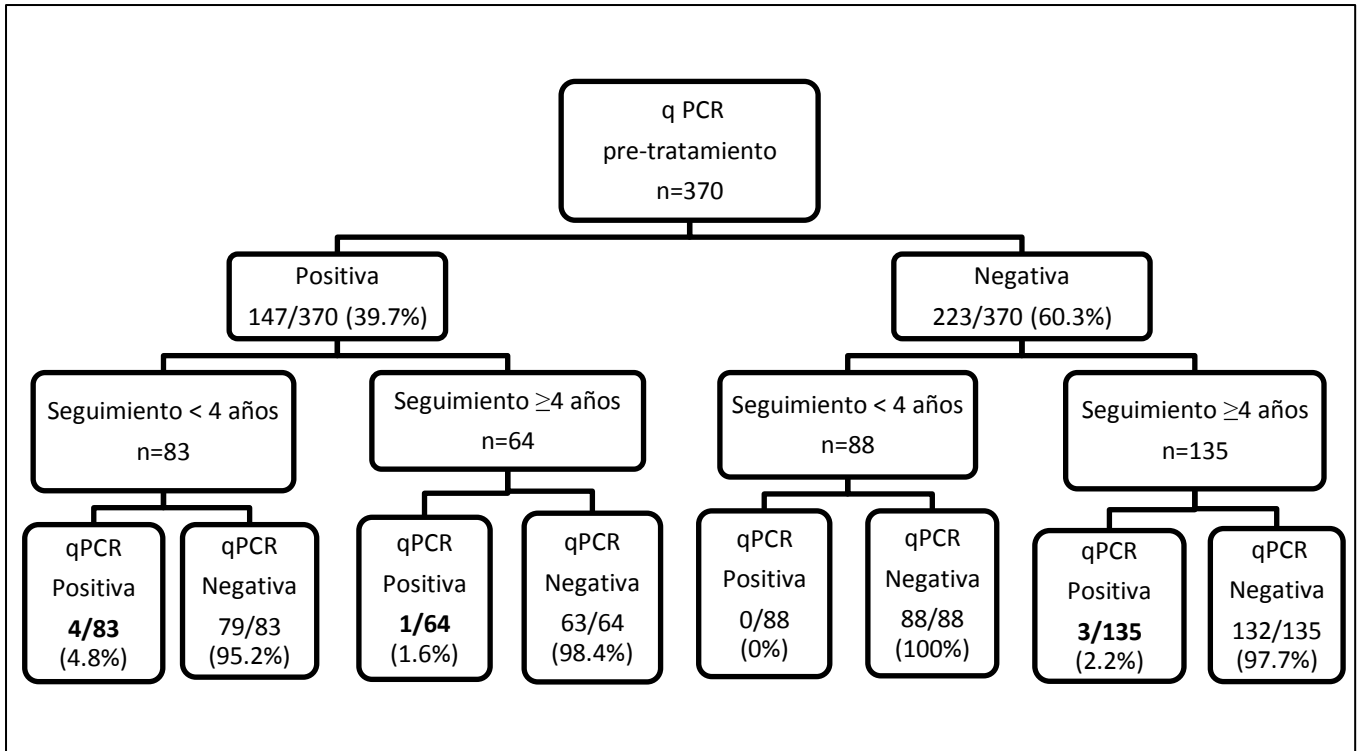


Figura 15 Distribución de los pacientes en función del tiempo de seguimiento

RESULTADOS

En la mitad de los pacientes con fracaso se había realizado un seguimiento corto (4/171, 2.3%) mientras que la otra mitad había sido monitorizados durante un período más largo (4/199, 2%).

Las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con fracaso de tratamiento se resumen en la tabla siguiente.

Pte	Sexo	Origen	Alteracion visceral	qPCR pretratamiento	Tiempo de positividad de qPCR	Tratamiento completo
1	F	Bolivia	No	Positiva	2 años	SI
2	F	Brasil	Dolicocolon	Positiva	5 años	SI
3	F	Bolivia	No	Positiva	3 años	NO (10d)
4	F	Bolivia	No	Negativa	5 años	NO (30d)
5	F	Bolivia	No	Negativa	8 años	NO (30 d)
6	F	Bolivia	Ectasia esofágica	Positiva	2 años	SI
7	F	Bolivia	No	Positiva	3 años	NO (30d)
8	F	Bolivia	No	Negativa	4 años	SI

Tabla 13. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con fracaso de tratamiento

Cinco pacientes continuaron el seguimiento después de detectar el fracaso del tratamiento. En tres de ellos (casos 1, 2 y 3), se detectó parasitemia postratamiento en varias determinaciones de forma intermitente. En los otros dos casos (casos 4 y 8), solo se registró un resultado positivo de qPCR.

El caso 1 se incluyó en el ensayo clínico Chagasazol. El paciente fue aleatorizado en el grupo de dosis bajas de posaconazol (100 mg dos veces al día), detectándose parasitemia un año después del tratamiento con posaconazol (9). Se administró un segundo tratamiento con BZL. Desafortunadamente, dos años después del tratamiento con BZL, se detectó parasitemia una vez más. El paciente se encuentra actualmente en tratamiento con Nifurtimox.

RESULTADOS

El cronograma de seguimiento de qPCR en pacientes con fracaso del tratamiento se representa en la siguiente figura.

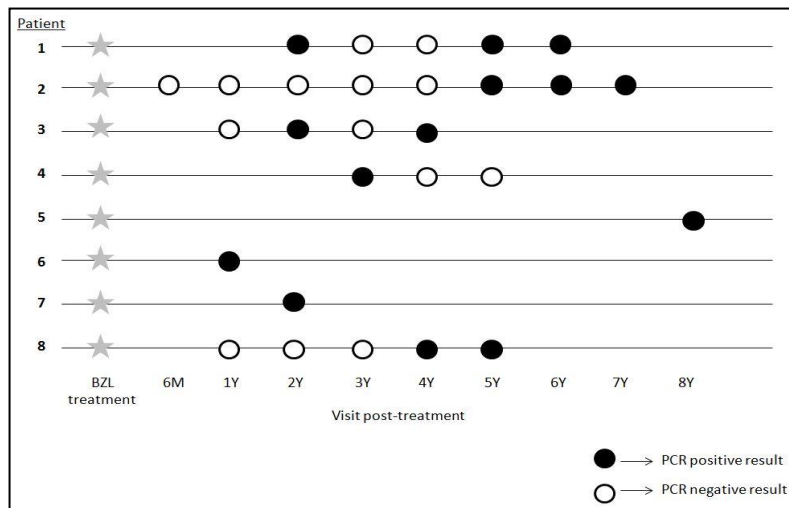


Figura 16: Seguimiento post-tratamiento de los pacientes con fracaso de tratamiento

Cuatro pacientes con fracaso (4/300, 1.3%) habían completado el tratamiento correcto con BZL, mientras que los restantes tenían un tratamiento incompleto (4/57, 7%). La diferencia estadística fue significativa entre ambos grupos ($p = 0.02$).

Seguimiento serológico

Doscientos setenta y cinco pacientes fueron monitorizados durante el seguimiento mediante serología y qPCR simultáneamente.

Solo se detectó pérdida de los anticuerpos anti-*T.cruzi* en 4 pacientes (4/275, 1,5%).

Ninguno de los pacientes en los que se documentó el fracaso de tratamiento serorevirtió.

6.3. Utilidad de la PCR a tiempo real como marcador de fracaso de tratamiento con benznidazol o posaconazol en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas: ensayo clínico Chagasazol

Características clínicas y epidemiológicas

Desde septiembre de 2010 hasta agosto de 2011, 79 pacientes fueron incluidos en el estudio. La distribución aleatoria en las tres ramas del se observa en la figura siguiente:

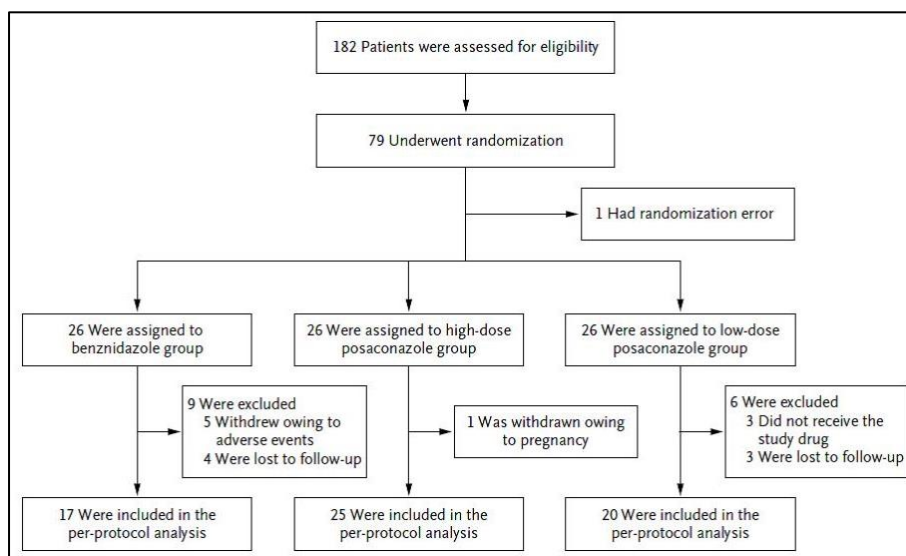


Figura 17. Randomización pacientes en las tres ramas del estudio Chagasazol

Se produjo un error de aleatorización en un paciente dado que la qPCR pre-tratamiento fue negativa y que tuvo que ser excluido.

Hubo 47 mujeres y 31 hombres, y el país de origen de la mayoría de los pacientes (75/78, 96.1%) fue Bolivia. La edad media fue de 39 años (DE 9,2).

En cuanto a la afectación visceral, 51 pacientes (65,3%) se clasificaron como forma indeterminada, 17 (21,8%) presentaban afectación cardíaca, 5 (6,4%) digestiva y 5 (6,4%) presentaban formas formas mixtas.

Las características clínicas basales estaban equilibradas entre los diferentes brazos de tratamiento.

RESULTADOS

En cuanto al seguimiento de los pacientes: 3 pacientes de la rama de PSL a dosis bajas se perdieron antes de recibir ninguna dosis del fármaco, 5 pacientes de la rama de BZL tuvieron que abandonar el tratamiento debido a los efectos adversos y 7 pacientes (3 que recibieron PSL a dosis bajas y 4 de BNZ) se perdieron durante el seguimiento.

Una paciente en el brazo de dosis altas de POSA quedó embarazada mientras recibía el medicamento y tuvo que ser excluida. El hecho de estar tomando el fármaco durante el embarazo no tuvo repercusiones en el recién nacido que nació sano.

Monitorización de la eficacia de tratamiento mediante qPCR

Todos los pacientes incluidos en el estudio presentaban una qPCR positiva al inicio del estudio.

Después de completar el tratamiento y durante todo el período de seguimiento, se obtuvieron resultados negativos de qPCR de forma sostenida en 16 pacientes de la rama que tomó BZL, 2 en la rama de dosis bajas de PSL y 5 que recibieron dosis altas de PSL.

En cuanto a los pacientes en los que se detectó parasitemia mediante qPCR durante el seguimiento solo un paciente tratado con BLZ presentó resultado positivo de qPCR durante el seguimiento. La determinación fue puntual durante el seguimiento el Ct cercano al punto de corte. Por el contrario, tanto en la rama de PSL a dosis bajas como a dosis altas, 19 pacientes presentaron resultados positivos de qPCR.

Los resultados de fracaso de tratamiento fueron diferentes en función del tipo de análisis de los resultados, con diferencias más marcadas en el análisis por protocolo.

- Resultados según el **análisis por intención de tratamiento**: en el 92,3% de los pacientes que recibieron PSL a dosis bajas, el 80,7% que recibieron PSL a dosis altas y el 38,4% de los pacientes tratados con BZL fueron considerados fracasos de tratamiento.

RESULTADOS

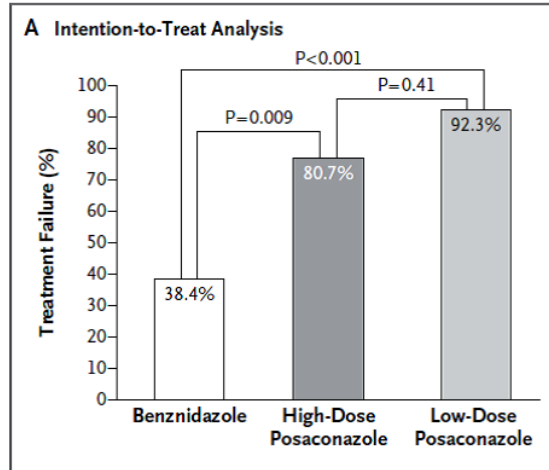


Figura 18: Resultados de fracaso de tratamiento en las tres ramas del estudio en el análisis por intención de tratamiento

- Resultados según el **análisis por protocolo**: en el 90% de los pacientes que recibieron PSL a dosis bajas, el 80% que recibieron PSL a dosis altas y únicamente el 5.9% de los pacientes tratados con BZL fueron considerados fracasos de tratamiento.

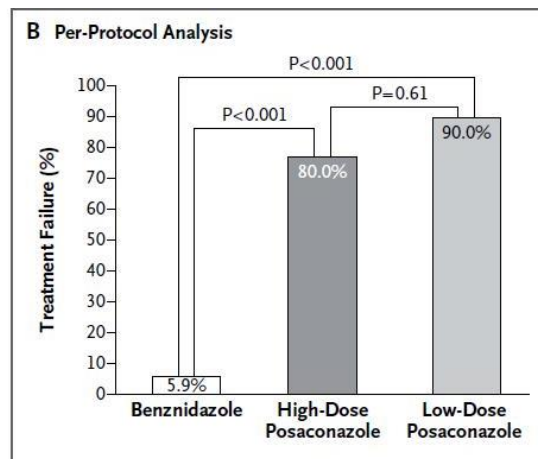


Figura 19: Resultados de fracaso de tratamiento en las tres ramas del estudio en el análisis por protocolo

A partir del día 14 de tratamiento, la prueba de qPCR fue negativa en todos los pacientes independientemente de la rama de tratamiento a la que pertenecían. La detección del ADN de *T.cruzi* comenzó a detectarse de nuevo el día 60 que coincide

RESULTADOS

con el momento de finalización del tratamiento en dos pacientes de la rama de PSL a dosis bajas.

El tiempo transcurrido hasta la detección de la parasitemia se presenta en la figura siguiente

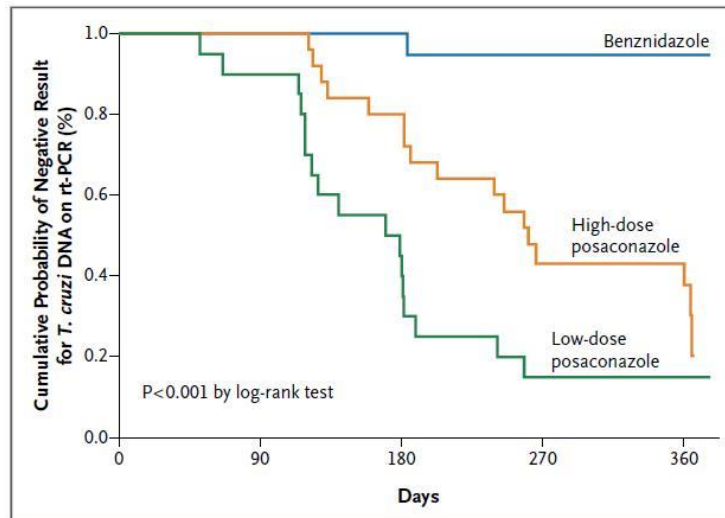


Figura 20: Curva Kaplan-Meier fracasos de tratamiento en las tres ramas del ensayo

6.4. Resultados programa de control de calidad

Al analizar las muestras de CCE enviadas desde el centro externo (INGEBI-CONICET) se obtuvo un 76.04% de concordancia entre los resultados positivos de qPCR obtenidos en nuestro laboratorio con respecto al de referencia.

Por el contrario, la concordancia en los resultados negativos fue del 100%.

Los resultados obtenidos fueron variables dependiendo de la UDT. Se obtuvo un 100% de concordancia para las tres concentraciones de TcIa, y a 10 y 100 par. eq./mL de TcVI, para la que sin embargo disminuyó a la concentración de 1 par. eq./mL hasta un 75,00%. Por otro lado, el análisis de las muestras de TcId y TcV arrojó valores concordancia más bajos (50% y 75% respectivamente a 10 par. eq./mL, y 12.5% y 0% a 1 par. eq./mL) excepto a 100 par. eq./mL que obtuvieron el 100% .

RESULTADOS

En la siguiente tabla se pueden observar los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en comparación a los obtenidos por el laboratorio de referencia.

<i>T. cruzi</i> UDT	Laboratorio	Total de réplicas	Número de réplicas positivas		
			1 par. eq./mL	10 par. eq./mL	100 par. eq./mL
Tcla K98	Core Lab	11	11	11	11
	LabC SOP1	8	8	8	8
TcId Sylvio	Core Lab	11	1	10	11
	LabC SOP1	8	1	4	8
TcV	Core Lab	11	1	11	11
	LabC SOP1	8	0	6	8
TcVI	Core Lab	11	9	11	11
	LabC SOP1	8	6	8	8

Tabla 14. Resultados cualitativos programa de CCE.

CoreLab: Laboratorio de referencia. **LabC-SOP1** protocolo de qPCR-1 **LabC-SOP2** protocolo de qPCR-2.

Se aprovechó la realización de este CCE para evaluar la diferencia de resultados entre el protocolo de qPCR-1 utilizado en el período entre 2010 y 2013 y el qPCR-2 utilizado entre 2013 y 2018. El cambio incluyó un ajuste de los cebadores y las concentraciones de la sonda, y probar diferentes mezclas de PCR para mejorar la sensibilidad de su método. En general, el protocolo qPCR-2, consiguió reducir el valor de Ct alrededor de 4 unidades, acercándose a los valores de Ct obtenidos por el laboratorio de referencia. Además fue capaz de detectar tres muestras positivas adicionales (1 y 10 eq./mL de TcId, y 1 eq./mL de TcV) que no habían sido detectables usando el protocolo original. En la siguiente tabla se compara los resultados de qPCR obtenidos por ambos métodos y los resultados del laboratorio de referencia.

RESULTADOS

<i>T. cruzi</i> stock	Concentration (par. eq./mL)	Core Lab			LabC-SOP1		LabC-SOP2	
		Ct1	Ct2	Ct3	Ct1	Ct2	Ct1	Ct2
Tcla K98	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	1	31.79	29.75	29.64	35.30	36.50	30.85	31.76
	10	26.94	26.91	27.55	31.70	33.40	27.64	27.91
	100	22.45	22.83	22.78	31.20	27.60	23.06	22.83
Tcld	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sylvio	1	ND	ND	32.03	ND	ND	ND	37.39
X10 Cl1	10	32.62	35.21	31.05	ND	ND	37.26	34.35
	100	28.96	30.23	28.58	33.50	34.20	29.23	30.20
TcV	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
LL014-1-	1	ND	37.28	ND	ND	ND	34.55	ND
R1 Cl1	10	32.75	35.95	31.85	37.20	38.40	34.21	34.07
	100	27.38	27.60	28.04	32.70	32.10	28.99	28.17
TcVI CL-	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brener	1	33.01	30.88	31.41	35.60	36.90	33.03	32.31
	10	28.41	28.39	27.98	33.60	31.40	28.65	29.14
	100	24.63	24.65	24.57	29.10	28.80	25.49	25.57

par. eq./mL: parasite equivalents in 1 mL of blood; SOP: Standard Operating Procedure; Ct: Cycle threshold; ND: non-detectable

Tabla 15. Comparación valores de Ct entre los dos protocolos de qPCR utilizados
CoreLab: Laboratorio de referencia. **LabC-SOP1** protocolo de qPCR-1 **LabC-SOP2** protocolo de qPCR-2.

RESULTADOS

DISCUSIÓN

DISCUSION

7. DISCUSION

Como ya se ha comentado anteriormente, en la EC en fase crónica la parasitemia es intermitente y el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos mediante técnicas serológicas. La sensibilidad de las técnicas moleculares es muy variable y un resultado negativo no permite descartar la infección. La utilización de la PCR, y en concreto de la PCR a tiempo real, en el diagnóstico y seguimiento de pacientes en fase crónica en una zona no endémica es el principal objetivo de esta tesis.

Utilidad de la PCR en la fase crónica de la EC en ausencia de tratamiento

Con el objetivo de evaluar la utilidad clínica de la qPCR en fase crónica se analizaron los resultados obtenidos en una cohorte de 495 pacientes que no habían recibido tratamiento tripanocida.

La mayor parte eran mujeres de origen boliviano en fase indeterminada de la EC (88). Las características clínicas y epidemiológicas de estos pacientes son similares a los descritos en otras series fuera del área endémica, donde la población es generalmente más joven y presenta tasas de afectación orgánica más bajas que en áreas endémicas (168)(169)(170).

La qPCR permitió detectar la parasitemia en el 42% de los pacientes, este nivel de detección tan bajo de sensibilidad hace que la qPCR presente un escaso valor diagnóstico en esta fase de la EC, ya que un resultado negativo no permite descartar la infección (130). Este porcentaje de positividad es similar al que se ha obtenido en otros estudios españoles, con valores que varían entre el 28 % y el 72% (171)(169)(170)(172)(173). El hecho de no incluir pacientes con parasitemias potencialmente más altas, como mujeres embarazadas o pacientes inmunodeprimidos, podrían explicar que este porcentaje de positivos no sea mayor (35)(93).

DISCUSION

En la tabla 16 se resumen las características clínicas, epidemiológicas y de protocolo de PCR utilizados en las principales cohortes españolas que incluyen pacientes en fase crónica.

	Pérez-Ayala et al 2009	Muñoz et al 2009	Murcia et al 2010	Norman et al 2011	Ramos et al 2012
PCR	stDNA Convencional	St DNA Nested PCR qPCR	kDNA Convencional	kDNA Convencional	k DNA Convencional
Vol sangre	-	-	10 mL	4mL >1PCR/paciente	10 mL
N ^a pacientes	252	200	181	246	128
Media edad	36 (29-44)	36 (+/-11)	33 (+/- 11)	37 (16-64)	35 (0-72)
Sexo	32% H	24% H	-	32% H	36% H
Procedencia	Bolivia 97%	Bolivia 87%	Bolivia 97,2 %	Bolivia 96%	Bolivia 79%
PCR+	212/337 63%	56/200 28%	72% 19-49 y 48% >50	137-157/246 38-42%	66%
PCR-Cardiaca	-	-	No asociacion	No asociacion	-
PCR-GI	-	-	No asociacion	-	-

Tabla 16. Características de las principales series españolas que utilizan la qPCR en la fase crónica de la EC.

El porcentaje de positividad de qPCR en cohortes fuera del área endémica son sensiblemente menores a los obtenidos en áreas endémicas, que en algunas series obtienen valores superiores al 80% (126). Estas diferencias también se observan al comparar entre diferentes países latinoamericanos. Según datos extraídos del estudio BENEFIT, la mediana de la parasitemia detectada en Argentina y Colombia fue aproximadamente 20 veces superior a la de pacientes con características clínicas comparables en Brasil (174). Estas diferencias geográficas se deben principalmente a la presencia de distintos linajes de *T.cruzi* causantes de la infección. En estudios realizados en Brasil, tanto la carga parasitaria como la cinética del parásito están directamente ligadas con el linaje del parásito (147). En nuestro caso, a pesar de no haber realizado estudios de tipado, todos los pacientes procedían de Bolivia donde

DISCUSION

predomina TcV, lo cual hace pensar que este no es un factor determinante para los resultados obtenidos en esta cohorte (175)(176).

La disminución significativa del porcentaje de positividad de qPCR en pacientes que llevan más de cinco años en España respecto a los recién llegados puede explicar el menor porcentaje de positivos de PCR en series fuera del área endémica. Este dato concuerdan con los ya descritos en otra serie española en 2010 (171). Teniendo en cuenta que la parasitemia en el tercer trimestre de gestación es factor de riesgo de la transmisión, el hecho de que las tasas de transmisión congénita son menores en las series seguidas fuera del área endémica también sería congruente (62).

Un resultado positivo de qPCR no se relacionó con la presencia de anomalías viscerales, cardíacas ni digestivas. Estos datos también son concordantes con la mayor parte de las series publicadas tanto en área endémica como no endémica (171)(90)(172). Aunque también existen datos que asocian la parasitemia medida por PCR con la progresión de la cardiopatía (177). Únicamente en el caso de la transmisión congénita está bien establecida la relación entre parasitemia detectada en el tercer trimestre de gestación y el riesgo de transmisión de la enfermedad al recién nacido (35).

La sensibilidad de la qPCR depende de varios factores propios de la técnica y que ya han sido mencionados, como el volumen de sangre analizado, el protocolo de qPCR utilizado, las secuencias de cebadores y sondas así como de las condiciones del termociclador (126).

Pero actualmente y siguiendo los estándares de calidad de la técnica, la qPCR presenta un límite de detección por debajo de 0.5 ps/ml, lo que supone una muy buena sensibilidad siempre que el parásito se encuentre presente en la muestra de sangre. De hecho, el aumento del porcentaje de positividad de qPCR observado al utilizar muestras seriadas de sangre se debe a que la cantidad de muestra analizada es mayor (136). En nuestro caso, sólo se realizaron dos amplificaciones por cada

DISCUSION

extracción de ADN, lo cual podría justificar una menor sensibilidad que la descrita en otras series.

Por el contrario, el protocolo de qPCR utilizado es uno de los que presentó mejor sensibilidad en el estudio realizado por el grupo de trabajo en Argentina en 2011 (129). Además se utilizó sangre pre-tratada con GEB y la extracción de ADN se realizó mediante un equipo automatizado de extracción que permiten aumentar la eficacia en la recuperación del material genético, mejorando la sensibilidad final de la técnica (130)(137).

Así pues, los factores relacionados con el hospedador, el parásito y aquellos que influyen en su equilibrio finalmente determinan la presencia en sangre periférica en la fase crónica y por tanto, las que más influyen en la posibilidad de detectar ADN de *T.cruzi* mediante qPCR.

Además del linaje de *T.cruzi* existen variables como la coinfección con otros parásitos, la dieta o el estilo de vida que pueden influir en su comportamiento. La prevalencia de geohelminos es muy elevada en población latinoamericana, alcanzando valores superiores al 20% si se incluye *Strongyloides stercoralis* (178)(179). Debido a la alta prevalencia de ambas infecciones, la coinfección geohelminos-*T.cruzi* es frecuente, detectándose en el 18.5% de pacientes en una serie publicada por nuestro grupo en 2016. Estos datos se confirmaron posteriormente en un segundo estudio realizado en un importante grupo de donantes con EC en el que además de observó que la coinfección por helmintos y especialmente por *S. stercoralis* se ha asociado significativamente con una mayor detección de ADN de *T.cruzi* en sangre periférica (180). Esta relación refleja la acción inmunomoduladora de los helmintos y especialmente *S.stercoralis* en pacientes con EC (181). Esta acción inmunomoduladora puede explicarse porque la respuesta Th2 generada por *S stercoralis* ejerce un efecto supresor de la respuesta Th1 que genera *T.cruzi*, rompe el equilibrio infección/hospedador facilitando la salida de tripomastigotes a sangre periférica (86)(87).

DISCUSION

Otros datos sugieren la importante flexibilidad y adaptación de *T.cruzi* a cambios ambientales y el estado nutricional como el que sufre la población latinoamericana al llegar al país receptor (182). En este sentido, existen estudios que indican que la microbiota, tanto del hospedador modulan su respuesta a la infección, idea que refuerza la importancia de factores externos en el comportamiento del parásito (183).

Variables como viajes a zona endémica durante el seguimiento para descartar posibles reinfecciones, la existencia de coinfección por *S. stercoralis* u otras variables relacionadas con la dieta o el estilo de vida, no pudieron ser recogidas lo cual limita la interpretación de estos resultados.

La diferencia en el porcentaje de positividad de qPCR en pacientes en función del tiempo de residencia fuera del área endémica refuerza la idea de la influencia de factores externos sobre la dinámica del parásito.

La qPCR no es una medida dinámica y únicamente da información del momento en el que se ha tomado la muestra. El seguimiento regular y continuado de un grupo de pacientes debido a una rotura de stock de BZL, nos ha permitido obtener información del comportamiento del parásito y su presencia en sangre periférica en una zona en la que no hay posibilidad de reinfección. Dado que se podría excluir la influencia del linaje, parece probable que factores genéticos relacionados con el hospedador que determinen la respuesta inmune serían los más implicados en esta diferencia de comportamiento (184).

Se sabe que hay factores de la inflamación que se han relacionado más directamente con el control inmunológico frente a la EC y que podrían favorecer la presencia de parásito en sangre (86). En un estudio realizado por nuestro grupo en el que se compararon parejas de hermanos infectados con pacientes no emparentados, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre parasitemia y relación familiar, lo cual refuerza la posibilidad de que factores genéticos puedan estar implicados (185).

DISCUSION

La utilización de tecnología de secuenciación de nueva generación ha permitido iniciar estudios de marcadores genéticos del hospedador y como estos a través de factores inflamatorios principalmente, pueden influir en la forma de presentación de la enfermedad (186). La parasitemia sostenidamente positiva, negativa o intermitente, al igual que la determinación puntual, tampoco se ha relacionado con la aparición de complicaciones viscerales.

qPCR como marcador de fracaso terapéutico de Benznidazol

Dado que la qPCR no es útil en el diagnóstico ni se asocia a la aparición de manifestaciones viscerales propias de la EC crónica, actualmente su mayor utilidad es la monitorización de pacientes tratados (187). Un resultado positivo de qPCR es indicador de fracaso de tratamiento.

En la práctica clínica habitual de las unidades de Salud Internacional de PROSICS, se realiza seguimiento anual todos los pacientes con EC que han sido tratados con BZL. Cada vista de seguimiento incluye una determinación serológica y la realización de una qPCR además de la anamnesis y las pruebas complementarias dirigidas a la detección precoz de complicaciones viscerales de la EC crónica. Para evaluar la eficacia del tratamiento con BZL, se han analizado los resultados de qPCR post-tratamiento de 370 pacientes.

Antes de iniciar el tratamiento también se realizó una determinación de qPCR, que resultó positiva en el 40% de los casos, dato superponible a los ya presentados previamente.

Sólo el 2.1% de los pacientes presentaron algún resultado positivo de qPCR después del tratamiento con BZL. Más de la mitad de estos pacientes realizaron un seguimiento de más de cuatro años acudiendo a todas las visitas clínicas programadas de forma regular. El porcentaje de fracaso de tratamiento es similar a un estudio previo realizado en España, donde la tasa de positividad de qPCR post-tratamiento fue del 3,3% en un período de seguimiento de siete años (187).

DISCUSION

Al igual que ocurre con el porcentaje de positividad de PCR en ausencia de tratamiento, los porcentajes de parasitemia en pacientes tratados en áreas no endémicas son menores que los obtenidos en áreas endémicas, donde las cifras de fracaso de tratamiento con BZL alcanzan cifras entre 6% y 30% (188). En el contexto de dos ensayos clínicos realizados en América Latina, el nivel de fracaso de BZL fue aún mayor, detectando parasitemia en el 46% en pacientes con cardiopatía incluidos en el estudio BENEFIT y del 39,6% en niños menores de 14 años en Argentina (143)(150). A pesar de estos resultados, la tasa de fracaso resulta más alta en el grupo placebo en ambos ensayos clínicos. Sin embargo, en un tercer ensayo realizado por Cardoso et al en 2000 pacientes en Brasil la tasa de pacientes con parasitemia indetectable tras dos años de seguimiento post-tratamiento aumentó hasta el 83.4% con una clara diferencia significativa respecto al grupo de pacientes no tratados (144).

En el caso de NFX las tasas de fracaso de tratamiento utilizando la PCR como marcador, son ligeramente menores a las descritas por BZL. En un estudio realizado en Suiza las tasas de fracaso a los tres años fue sólo del 2.7% y del 6.1% en un estudio realizado en Chile tras 6 años de seguimiento. Ambos estudios fueron realizados en áreas libres de transmisión vectorial (Chile lo está desde 1999) lo cual podría justificar estos menores porcentajes de fracaso (189)(190).

Se sabe que la posibilidad de detección de parasitemia después del tratamiento aumenta con el tiempo. Durante el tratamiento o incluso hasta un año después, la parasitemia indetectable puede llegar al 100% (187). Sin embargo, después de esta disminución temprana de la parasitemia, el porcentaje de fracasos aumenta (159). Existen estudios como el llevado a cabo por Britto et al con seguimientos a muy largo plazo, en los que las tasas de fracaso fueron del 35% tras 20 años de seguimiento (191).

La mitad de nuestros pacientes presentaron un resultado positivo de qPCR después de al menos cuatro años de seguimiento y un 56% habían realizado como mínimo tres

DISCUSION

controles post-tratamiento, lo que subraya la importancia de un seguimiento regular a largo plazo.

La qPCR no es una medida dinámica y solo proporciona información del momento de toma de la muestra, lo cual limita la posibilidad de detectar al parásito en un momento diferente. Por esta razón, a pesar de hacer seguimientos regulares y dado que la parasitemia es intermitente en muchos pacientes, un resultado negativo de qPCR aunque sea sostenido en el tiempo, no puede descartar el fracaso a largo plazo.

El hecho de que tres pacientes en los que el tratamiento fracasó, presentaran un resultado negativo de qPCR antes del tratamiento sugiere que un resultado negativo de qPCR previo al tratamiento no es un buen predictor de una buena respuesta terapéutica.

En nuestra cohorte, el 16% de los pacientes tuvieron que interrumpir el tratamiento por presentar efectos adversos. Este dato es similar al 12.7% ya descrito anteriormente (155).

Si se considera únicamente el subgrupo de pacientes que no completaron el tratamiento, la tasa de fracaso del tratamiento aumenta del 2.2% al 7% con una diferencia estadísticamente significativa. Estos datos son concordantes con los datos ya publicados por Murcia et al en el cual el subgrupo de pacientes con tratamiento incompleto también presentaba mayor tasa de fracasos (187). Por el contrario, en un estudio realizado en Argentina, el 20% de 81 pacientes que habían tenido que interrumpir el tratamiento con BZL tras años de seguimiento negativizaron la serología (192). Estos estudios son la base del tratamiento intermitente con BZL que ha sido probado con buenos resultados de eficacia durante el tratamiento disminuyendo los efectos secundarios del BZL, a pesar de que el seguimiento fue a muy corto plazo (192).

En nuestra cohorte, solo cuatro pacientes (1%) lograron seronegativizar durante el seguimiento. La monitorización de la respuesta serológica puede ser útil para detectar la tendencia de los anticuerpos a disminuir. Se podría considerar una buena

DISCUSION

respuesta al tratamiento cuando se detecta un resultado de PCR negativo sostenido y se observa una disminución en el nivel de anticuerpos (187).

Los procedimientos clínicos y los regímenes de tratamiento de rescate, tras el fracaso de BZL no están claros y se plantea como un desafío en el manejo clínico de estos pacientes.

El seguimiento de esta cohorte no fue regular, está basado en los datos reales de seguimiento y no a un protocolo de estudio prospectivo. Sin embargo, el uso de datos de la práctica clínica habitual permite evaluar la eficacia real del tratamiento.

qPCR como evaluador de eficacia en ensayos clínicos

En el ensayo clínico Chagasazol, se probó la eficacia de PSL como tratamiento de la EC crónica. Ante la falta de un marcador que permita confirmar la curación a corto plazo, la parasitemia medida por qPCR fue utilizado como marcador precoz de fracaso de tratamiento (145). Se definió como fracaso un resultado positivo de qPCR y realizando una única extracción que se amplificó por duplicado (167).

La utilización de PSL en el tratamiento de la EC se basa en modelos experimentales realizados en ratones en los que PSL presentó muy buenos resultados de eficacia frente a *T.cruzi* (193)(194). Estos buenos resultados unidos a la experiencia en el uso de este fármaco como tratamiento profiláctico frente a la infección fúngica invasora en pacientes severamente inmunosuprimidos, hizo que las expectativas de PSL como tratamiento de la EC fuesen muy altas (195)(196)(197).

Para el estudio, se diseñaron tres ramas: una en la que se utilizó PSL a las dosis máximas aprobadas en humanos (400 mg dos veces al día vía oral), otra con PSL a dosis reducida (100 mg dos veces al día vía oral) y una tercera de BZL a dosis estándar. La duración del tratamiento fue para todas las ramas de 60 días.

El objetivo de la rama de PSL a dosis reducida fue la de abaratar costes ya que el elevado precio de PSL podría ser un factor limitante de su uso. Esta reducción de

DISCUSION

dosis se basó en datos de estudios en ratones en los que las dosis de PSL utilizada de forma habitual es 10 veces superior a la requerida (198).

La carga parasitaria se redujo significativamente hasta niveles indetectables durante el tratamiento en las tres ramas del estudio y todos los pacientes presentaron resultados negativos de qPCR a partir del día 14 de tratamiento y hasta el día 60 en el que se finalizó el tratamiento, excepto en dos de ellos incluidos en la rama de dosis bajas de PSL. Sin embargo, más del 90% de los pacientes tratados con PSL presentaron resultados positivos de qPCR durante el año de seguimiento (166). La eficacia de las dos pautas de tratamiento con PSL, a pesar de utilizar distintas dosis, fue semejante (90% vs 80%).

A diferencia de PSL, BZL mostró una actividad tripanocida mantenida en el tiempo. En todos los pacientes, excepto en uno, los resultados de qPCR fueron persistentemente negativos hasta el final del seguimiento. El único paciente tuvo una determinación positiva de cuatro en el mes 6 (Ct 39.9) con resultados negativos en el resto del seguimiento pero se consideró un fracaso del tratamiento de acuerdo con los criterios establecidos.

Debido a los resultados prometedores de PSL, este no fue el único ensayo clínico que evaluó su eficacia. El ensayo STOP-Chagas incluyó a 120 pacientes de varios países latinoamericanos y España. Se incluyeron cuatro ramas de tratamiento incluyendo el tratamiento combinado PSL+BZL y una rama placebo. El marcador utilizado para valorar eficacia tanto en un primer momento (180 días) como al final del seguimiento de un año fue una qPCR que amplifica kDNA. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad de la qPCR se realizaron tres extracciones de ADN y de cada una de ellas se realizaron 4 amplificaciones (12 amplificaciones en total) valorando como positivo la amplificación de más de una de las réplicas. A pesar de ello, los resultados fueron semejantes a los obtenidos en Chagasazol. PSL tanto en monoterapia como en tratamiento combinado presentó buena eficacia durante el tratamiento (90%

DISCUSION

efectividad) pero esta eficacia no se mantuvo en el tiempo y los pacientes fracasaron tanto a los 180 días (86.7%) como a los 360 (76.7%) (199).

PSL no ha sido el único inhibidor del ergosterol evaluado para el tratamiento de la fase crónica de la EC. El compuesto E-1224 (pro-droga del ravuconazol) fue evaluado en un ensayo clínico que incluyó a 231 pacientes reclutados en Bolivia. Los pacientes se incluyeron en cinco ramas de tratamiento: E-1224 a dosis altas, E-1224 a dosis bajas, E-1224 en un período de tiempo reducido, BZL estándar y placebo. Como en los dos ensayos anteriores, hubo una disminución de la parasitemia durante el tratamiento significativa en todas las ramas de tratamiento frente al placebo. Sin embargo, durante el seguimiento la respuesta no fue mantenida con tasas de fracaso en todas las ramas de E-1224 semejantes al placebo, excepto en la rama de dosis altas donde la respuesta fue significativamente superior a la del placebo (29% vs 9%) pero sin llegar a la eficacia demostrada por BZL (82%)(200).

En cuanto a la tolerancia, los pacientes tratados con BZL presentaron mayor número de efectos secundarios en los tres ensayos, llegando a obligar a la suspensión del tratamiento en algunos casos, mientras que tanto PSL como E-1224 fueron muy bien tolerados y no fue necesario interrumpir el tratamiento en ningún caso.

A pesar de estos resultados, la buena eficacia demostrada durante el tratamiento y el alto porcentaje de efectos adversos de BZL, se está evaluando su uso en combinación con benznidazol (estudio BENDITA).

Dada la escasez de opciones terapéuticas, se sigue trabajando en nuevas alternativas, explorando nuevos compuestos como el fexinidazol u otros inhibidores de la síntesis del ergosterol como el albaconazol o el voriconazol (152).

Las tasas de fracaso obtenidas con estos compuestos, contrastan con las descritas en el tratamiento con BZL en distintos ensayos clínicos como el BENEFIT y el estudio llevado a cabo por Galvao et al. que han sido mencionados anteriormente. En ambos estudios se realizó una única determinación de PCR convencional basada en la amplificación de kDNA (143)(150).

DISCUSION

La qPCR ha resultado ser un marcador eficaz de fracaso terapéutico tanto en estudios observacionales como en ensayos clínicos, permitiendo evaluar la eficacia de nuevas pautas de tratamiento de forma precoz, además de descartar fármacos no efectivos en el seguimiento a corto plazo. Sin embargo, no es el único marcador utilizado para valorar eficacia, existen ensayos que utilizan el resultado positivo de una técnica parasitológica como marcador de fracaso de tratamiento mientras que otros utilizan la negativización de la respuesta serológica como marcador de curación. La sensibilidad de las técnicas utilizadas influye directamente en los resultados de eficacia de las pautas de tratamiento evaluadas (160)(161). El xenodiagnóstico, la serología (principalmente basada en técnicas ELISA) y la PCR han sido las técnicas más utilizadas. En los ensayos que utilizan la serología como marcador de respuesta hay que valorar la necesidad de realizar un seguimiento mucho más prolongado y las distintas situaciones (niños, pacientes en fase aguda) en los que los títulos anticuerpos descienden más rápidamente. Como ventaja la demostración de la desaparición de los anticuerpos es un criterio definitivo de curación (201).

Respecto a las técnicas parasitológicas, el xenodiagnóstico presentó una menor sensibilidad que la PCR en el seguimiento de pacientes tratados (191). Además de presentar mejores resultados de sensibilidad por su objetividad, rapidez y facilidad técnica, la PCR es actualmente la utilizada con mayor frecuencia. Ambos marcadores parasitológicos presentan una disminución precoz de la parasitemia durante el tratamiento pero con el paso del tiempo los porcentajes de positividad aumentan de 10-20% a 40% para la PCR y el xenodiagnóstico respectivamente (159).

Utilidad programas de Control de calidad de qPCR

Se han realizado importantes esfuerzos en mejorar el límite de detección de la qPCR en la fase crónica de la EC, principalmente optimizando los protocolos de qPCR y aumentando el número de repeticiones (135)(136). A su vez, se han realizado estudios de validación analíticos que han permitido estandarizar la técnica especialmente en lo

DISCUSION

que se refiere a los resultados cualitativos (131)(132). Pero a pesar de todas estas estrategias, la realización de un programa de CCE permite aumentar la precisión de los resultados analíticos además de conferir mayor calidad y solidez a los resultados de qPCR minimizando las variaciones propias de la técnica (202).

Se han implementado programas de CCE en el diagnóstico de múltiples patógenos virales, bacterianos y parasitarios como el virus del dengue, *Leishmania* spp y *Plasmodium* spp (203)(204)(205).

En el caso de la qPCR de *T.cruzi* la primera utilización de un programa de CCE fue en el estudio internacional realizado en 2011 (129). A partir de entonces, el CCE se ha utilizado en varios ensayos clínicos incluyendo el estudio Chagasazol, que fue uno de los primeros en utilizarlo (166)(200).

El CCE está basado en el análisis en ciego de muestras contaminadas con distintas concentraciones de parásito que incluye distintos linajes de *T.cruzi*. Hay que tener en cuenta que el número de copias del fragmento de ADN utilizado como diana, especialmente en el caso del satDNA, no es el mismo en todos los linajes lo cual afecta a la sensibilidad de la qPCR. El número de repeticiones del ADN diana en TcI es de 5 a 10 veces menor al del resto de UDT, este hecho podría implicar peores resultados en los laboratorios de países donde predomina este linaje (16)(131). Utilizar diversas concentraciones de parásito permite evaluar no sólo el límite de detección de la técnica sino también la variabilidad de los resultados que es mucho mayor en las concentraciones bajas. Por último la estabilidad de las muestras de sangre mezclada con GEB permite la conservación de las muestras y el envío de los paneles desde el laboratorio de referencia al resto de laboratorios participantes (128). A pesar de toda la información que proporciona este programa de CCE hay variables que no puede controlar como el sistema de extracción de ADN o el tipo de termociclador utilizado así como la variabilidad achacable al operador.

Los resultados obtenidos tras la evaluación de los resultados del programa de CCE de qPCR en el cual se incluían los estudios Chagasazol y E-1224 no demostraron

DISCUSION

diferencias significativas a nivel cualitativo entre los laboratorios que realizaron la qPCR de ambos estudios y el de referencia (134).

Una ventaja añadida que da el CCE es la posibilidad de detectar de forma precoz errores de procedimiento de forma que permita corregir y mejorar los protocolos en el menor tiempo posible.

En nuestro caso, fueron los resultados de la evaluación del panel de CCE realizado en el contexto del estudio Chagasazol los que hicieron plantear el cambio de protocolo del utilizado en el período 2010-2013 al actual con la mejora de los resultados de Ct y el aumento del porcentaje de resultados positivos.

DISCUSION

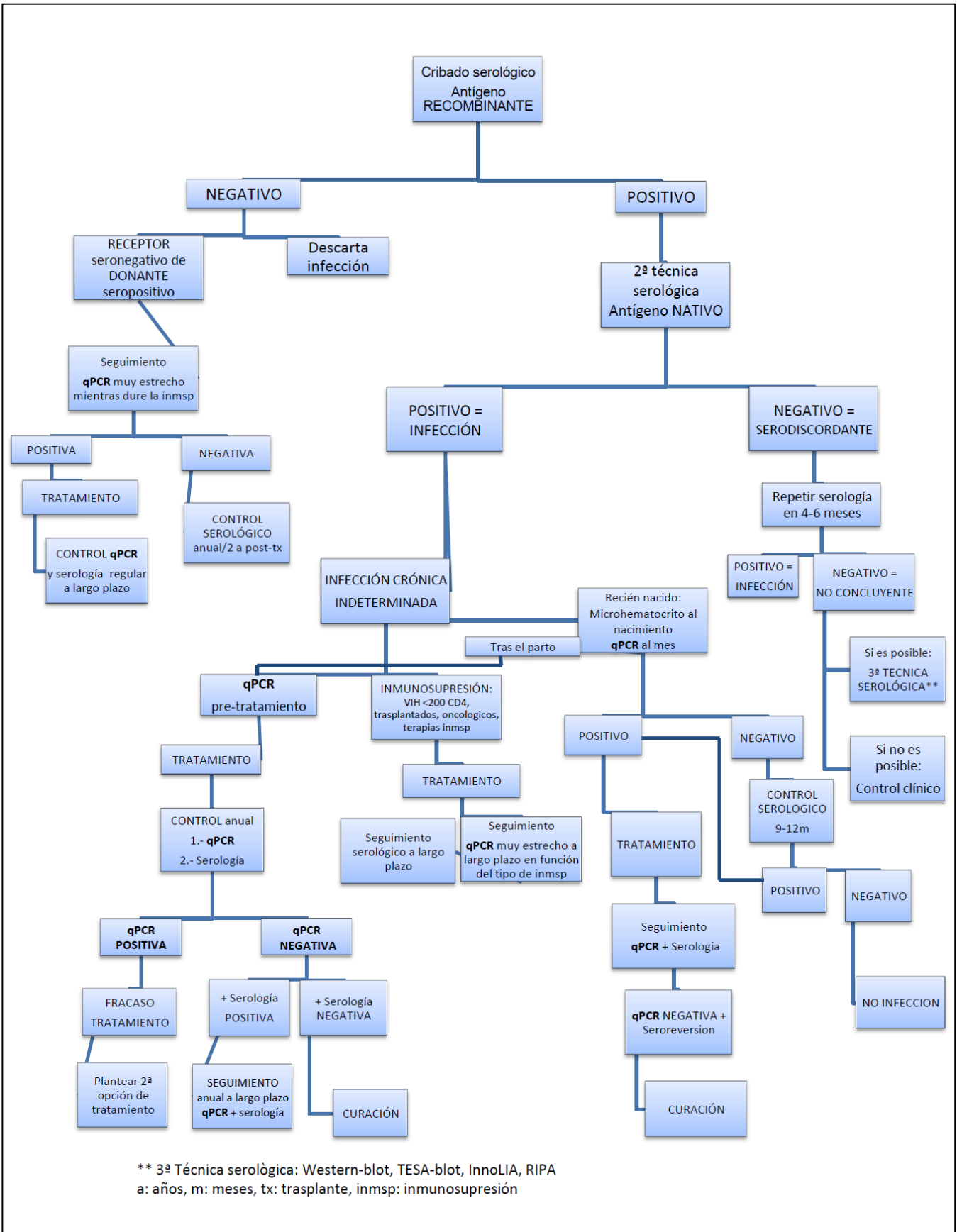


Figura 21. Esquema de diagnóstico y seguimiento de la Enfermedad de Chagas crónica fuera del área endémica: propuesta basada en los resultados de esta Tesis

DISCUSION

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

8. CONCLUSIONES

1.- El bajo porcentaje de positividad de la PCR a tiempo real en pacientes con Enfermedad de Chagas en fase crónica en nuestro medio, confirma su escaso valor diagnóstico en esta fase.

2.- La parasitemia medida por qPCR no se relacionó con la aparición de manifestaciones viscerales cardíacas y/o digestivas propias de la EC en fase crónica.

3.- Los pacientes con 5 años o menos de residencia en España presentaron valores de parasitemia significativamente mayores respecto a los que llevaban más tiempo ($P = 0.041$).

4.- La parasitemia se comporta de forma diferente en pacientes en los que se pudieron hacer determinaciones seriadas de qPCR en ausencia de tratamiento. Este hecho sugiere la influencia de distintos factores en el comportamiento del parásito.

5.- El porcentaje de pacientes tratados en los que se detecta parasitemia tras el tratamiento con Benznidazol es muy bajo en nuestra serie, lo cual refuerza su eficacia como tripanocida.

6.- El tratamiento incompleto con BZL se ha relacionado con un mayor porcentaje de fracaso del tratamiento ($P=0.02$).

7.- La monitorización regular mediante qPCR durante un período de tiempo prolongado, permite detectar los fracasos de tratamiento con BZL en zonas donde no es posible la reinfección.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

8.- Un resultado negativo de qPCR previo al tratamiento no es un buen indicador de buena respuesta terapéutica. Un resultado negativo post-tratamiento, a pesar de un seguimiento regular y prolongado, no permite descartar el fracaso a largo plazo.

9.- En el ensayo clínico Chagasazol, el 90% de los pacientes tratados con posaconazol, presentaron durante el seguimiento de un año, al menos un resultado positivo de qPCR, a pesar de que la carga parasitaria fue indetectable durante el tratamiento.

10.- La qPCR es el mejor y más precoz marcador de fracaso de tratamiento en los ensayos clínicos que evalúan nuevas pautas de tratamiento frente a la EC y permite descartar tratamientos ineficaces en un corto período de tiempo.

11.- Los programas de control de calidad externo confieren robustez a los resultados de qPCR a la vez que permiten evaluar de forma rápida posibles errores de protocolo.

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS DE FUTURO

9. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Son muchos los interrogantes que quedan por contestar respecto al comportamiento de la parasitemia en fase crónica. El alcance de la implicación del linaje, de la coinfección con otros parásitos o la existencia de factores genéticos en el hospedador no se conoce con exactitud. Para profundizar en ello, serían necesarios estudios prospectivos con seguimientos a largo plazo que incluyan el estudio de las UDT implicadas en la infección, estudios parasitológicos que permitan detectar coinfecciones y otros a nivel del hospedador y su capacidad de respuesta a la infección (186). El conocimiento de estos factores permitirá interpretar mejor los resultados de la qPCR en fase crónica, principalmente cuando se utiliza para monitorizar la respuesta de tratamiento.

Son necesarios biomarcadores precoces de progresión y curación de la EC. El principal objetivo de estos biomarcadores debe ser la monitorización de la evolución de los pacientes y confirmar de una forma precoz y definitiva la curación de la enfermedad(158). Para ello se están realizando estudios utilizando tecnología como la proteómica o metabolómica (206)(207).

Desde el punto de vista diagnóstico, a partir de la implementación de las plataformas serológicas de alta sensibilidad y especificidad es necesario replantearse el algoritmo diagnóstico basado en la concordancia de dos técnicas de principio diferente(107)(108). También es necesaria la disponibilidad de técnicas serológicas de confirmación de los casos serodiscordantes que sean accesibles y puedan ser implementadas en los laboratorios clínicos (116).

Es necesario avanzar en la mejora de las técnicas de diagnóstico rápido basadas generalmente en técnicas de inmunocromatografía que permitan acceder de forma más fácil al diagnóstico de la EC. Estas técnicas deben mejorar su sensibilidad para

permitir cribar la EC principalmente en áreas endémicas pero también en programas de atención comunitaria en áreas no endémicas (208).

Respecto a las técnicas moleculares, el mayor reto está en mejorar la sensibilidad de la PCR sobretodo en su utilización como marcador de fracaso terapéutico. Para ello existen distintas estrategias que intentan evitar el aumento de número de réplicas, para ello se están diseñando nuevas dianas de amplificación, protocolos de qPCR multiplex que permita amplificar tanto satDNA como kDNA (135)(138). La utilización de sistema de extracciones automatizadas e incluso de kits comercializados favorece la implementación de esta técnica siguiendo los estándares de calidad necesarios (137).

La implementación de técnicas de PCR destinada al tipado es necesario para caracterizar epidemiológicamente la EC y las implicaciones clínicas que puede tener el conocer los linajes circulantes y causantes de la infección (209).

Los fracasos de tratamiento detectados tanto con BZL, como con NFX o con inhibidores de la síntesis del ergosterol hace que sean necesarios estudios de resistencias en cepas de *T.cruzi* tanto primarias como en pacientes con fracaso de tratamiento (27)(210). Estos estudios permitirían dirigir el tratamiento de rescate en aquellos pacientes donde el tratamiento inicial haya fracasado

Por último, las nuevas técnicas de biología molecular isotérmicas, como el LAMP, que se han desarrollado recientemente pueden ser una alternativa a la realización de la PCR sobretodo en el diagnóstico de casos agudos en áreas endémicas (140)(141).

Es necesario crear a nivel nacional e internacional, unos sistemas de control de calidad tanto serológicos como moleculares que refuerce los resultados de laboratorio permitiendo diagnosticar el mayor número posible de casos (134)(211). Actualmente se ha creado un grupo español en el que están representados la mayor parte de laboratorios donde la PCR de *T.cruzi* está implementada que pretende establecer un programa de control de calidad periódico que permita evaluar los resultados de la técnica y detectar de forma precoz posibles errores en los protocolos.

PERSPECTIVAS DE FUTURO

Sin duda el gran reto en la investigación de la EC es el desarrollo de nuevos fármacos y pautas de tratamiento eficaces y con mínimos efectos adversos, para ello es necesario el desarrollo de marcadores de curación que permita evaluarlos de una forma sensible y precoz (145).

Por último, son de gran importancia los programas de cribado de EC en población susceptible tanto en área endémica como no endémica. El acceso al diagnóstico y la instauración de políticas de salud pública coordinadas entre diferentes países que permitan disminuir los diferentes mecanismos de transmisión son necesarios para avanzar en el control de esta enfermedad (3).

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

CITAS BIBLIOGRAFICAS

10. CITAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodrigues Coura J, Carlos J, Dias P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2009; Vol. 104(Suppl. I): 31-40
2. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen, n sp, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1:159–218.
3. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. Front Public Heal 2019;7:166.
4. Coutinho M, Freire O, Carlos J, Dias P. The Noble Enigma: Chagas? Nominations for the Nobel Prize. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 1999; Vol. 94, Suppl. I: 123-129
5. Guhl F, Carlos Jaramillo RY, Gustavo Adolfo Vallejo FC-A. Trypanosoma cruzi DNA in human mummies. Lancet 1997; 349:1370.
6. Zabala JP. Historia de la enfermedad de Chagas en Argentina: evolución conceptual, institucional y política. História, Ciências, Saúde – Manguinhos, Rio de Janeiro 2009; v.16, supl.1:57-74.
7. Mazza S. La enfermedad de chagas em la republica Argentina. Mem Inst Oswaldo Cruz. Mem Inst Oswaldo Cruz 1949; 47:273–88.
8. Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J WF. A newly revised classification of the protozoa. J Protozool 1980 Feb;27(1):37-58.
9. Moreira D, López-García PN, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2004; 54: 1861–1875
10. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet 2018;391(10115):82–94.
11. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. Lancet 2010 Apr;375(9723):1388–402.
12. Gállego-Berenguer J. Manual de Parasitología. 2007.
13. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, Mena SS, Veazey P, Miles GA, Acosta N, de Arias AR MM. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. Nature 2003;421(6926):936-9.
14. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- agents: the need for an integrated approach. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003;2(1):12.
15. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP PS. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(1)1-12.
 16. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 2012;12(2):240–53.
 17. Ramirez JD, Hernandez C, Montilla M, Zambrano P, FI Orez AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses and Public Health* 2014, 61, 477–479 477
 18. Guhl F RJ. *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop* 2011;119(1)1-4.
 19. S. F. Brenière, R. Carrasco, S. Revollo, G. Aparicio, P. Desjeux MT. Chagas' Disease in Bolivia: Clinical and Epidemiological Features and Zymodeme Variability of *Trypanosoma Cruzi* Strains Isolated from Patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1989;41(5):521–9.
 20. del Puerto R1, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, Gianella A, Lora J, Velarde FU, Renjel LA, Miura S, Higo H, Komiya N, Maemura K HK. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(5)e687.
 21. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: Looking back and to the future. *Parasitology.* 2009;136(12):1509–28.
 22. Burgos JM1, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Brusses B, Favalaro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favalaro R SA. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis* 2010;51(5)485-95.
 23. Ortiz S1, Zulantay I, Solari A, Bisio M, Schijman A, Carlier Y AW. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Trop* 2012;124(3)243-6.
 24. Perez-Ramirez L1, Barnabé C, Sartori AM, Ferreira MS, Tolezano JE, Nunes EV, Burgarelli MK, Silva AC, Shikanai-Yasuda MA, Lima JN, Da-Cruz AM, Oliveira OC, Guilherme C, Bastrenta B TM. Clinical analysis and parasite genetic diversity in human immunodeficiency virus/Chagas' disease coinfections in Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1999;61(2)198-206.
 25. Herrera C, Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Sosa- S, Cafferata ML, et al. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma cruzi* from pregnant women and newborns from Argentina, Honduras, and Mexico suggests an association of parasite haplotypes with congenital transmission of the parasite. *J Mol*

- Diagn. 2019 Aug 23. pii: S1525-1578(19)30367-8
26. Segovia M, Carrasco HJ, Martínez CE, Messenger LA, Nessi A, Londoño JC, Espinosa R, Martínez C, Alfredo M, Bonfante-Cabarcas R, Lewis MD, de Noya BA, Miles MA LM. Molecular epidemiologic source tracking of orally transmitted chagas disease, Venezuela. *Emerg Infect Dis* 2013;19(7):1098-101.
 27. Murta SM, Romanha AJ. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 1998 Feb;116 (Pt 2):165–71.
 28. Rodrigues Coura J. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 2015;110(3):277–82.
 29. Norman FF, López-Vélez R. Mother-to-child transmission of *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas disease): a neglected problem. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014; 108: 388–390
 30. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro* 2015;110(3):363.
 31. Kemmerling U, Osuna A, Schijman AG, Truyens C. Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Review About the Interactions Between the Parasite, the Placenta, the Maternal and the Fetal/Neonatal Immune Responses. *Front Microbiol* 2019 Aug 14;10:1854.
 32. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: A prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1759–64.
 33. Bern C, Verastegui M, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis*;49(11):1667–74.
 34. Brutus L, Castillo H, Bernal C, Salas NA, Schneider D, Santalla JA, et al. Short report: Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 2010;83(5):1044–7.
 35. Murcia L, Simón M, Carrilero B, Roig M, Segovia M. Treatment of infected women of childbearing age prevents congenital trypanosoma cruzi infection by eliminating the parasitemia detected by PCR. *J Infect Dis*. 2017;215(9):1452–8.
 36. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T. Where do *Trypanosoma cruzi* go? The distribution of parasites in blood components from fractionated infected whole blood. *Transfus* 2016;56;2233–2238
 37. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, et al. Chagas disease and transfusion medicine: A perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus*. 2015;13(4):540–50.
 38. Smith K, Marcos LA. Pathogenesis of Chagas Disease: an Emphasis for Transplant Patient Populations. *Current Tropical Medicine Reports*. 2019.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

39. Len O, Los-Arcos I, Aguado JM, Blanes M, Bodro M, Carratalà J, et al. Documento de Consenso del Grupo de Estudio de la Infección en el Trasplante (GESITRA) perteneciente a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) sobre los Criterios de Selección del Donante de Órganos Sólidos en Relación a las Enfermedades Infecciosas. 2019
40. Hidron AI, Gilman RH, Justiniano J, Blackstock AJ, LaFuente C, Selum W, et al. Chagas cardiomyopathy in the context of the chronic disease transition. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(5).
41. Lattes R, Lasala MB. Chagas disease in the immunosuppressed patient. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):300–9.
42. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Sulleiro E, Moreso F, Berastegui C, et al. Prevalence of Chagas Disease among Solid Organ-Transplanted Patients in a Nonendemic Country. *Am J Trop Med Hyg*. 2018;98(3):742–6.
43. Pinazo M-J, Miranda B, Rodríguez-Villar C, Altclas J, Brunet Serra M, Cañas García-Otero E, et al. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. *Transplantation Reviews* 2011; 25:91–101
44. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Sulleiro E, Berastegui C, Jauregui A, Pont T, Los-Arcos I, Len O, Gavaldà J and Molina I. Case report: successful lung transplantation from a donor seropositive for trypanosoma cruzi infection (chagas disease) to a seronegative recipient. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97(4):1147–50.
45. Salvador F, Len O, Molina I, Sulleiro E, Sauleda S, Bilbao I, et al. Safety of Liver Transplantation With Chagas Disease-Seropositive Donors for Seronegative Recipients. *Liver Transpl*. 2011;17:1304–8.
46. Clemente WT, Pierrotti LC, Abdala E, Morris MI, Azevedo LS, López-Vélez R, et al. Recommendations for Management of Endemic Diseases and Travel Medicine in Solid-Organ Transplant Recipients and Donors: Latin America. *Transplantation*. 2018;102(2):193–208.
47. Robertson LJ, Devleeschauwer B, Alarcón de Noya B, Noya González O, Torgerson PR. Trypanosoma cruzi: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6): e0004656.
48. Alarcón De Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 2015;110(3):377–86.
49. De Cássia De Souza-Lima R, Das Graças M, Barbosa V, Rodrigues Coura J, Ruth A, Arcanjo L, et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2013; 46(4):510-514
50. Gomes C, Almeida AB, Rosa AC, Araujo PF, Teixeira ARL. American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *Int J Infect Dis*. 2019;81:81–4.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

51. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Ehrlich Sachs S, Sachs JD, et al. Control of Neglected Tropical Diseases. *N Engl J Med*. 2007 Vol. 357
52. WHO. <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>
53. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ, Bottazzi E, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 2013 April ; 13(4): 342–348.
54. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010;115(1–2):14–21.
55. Monge-Maillo B, Lopez-V Elez R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2017; 23:290-295
56. Gascon J, Bern C, Pinazo M-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010 Jul;115(1–2):22–7.
57. Pérez-Molina JA, Lopez-Pol AL, Treviña, Molina I, Goikoetxea J, Iraz-Méndez MD, et al. 6-year review of 1Redivi: a prospective registry of imported infectious diseases in Spain. *Journal of Travel Medicine*, 2017, 1–7
58. Bocanegra C, Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Pahissa A, Molina I. Screening for imported diseases in an immigrant population: Experience from a teaching hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2014;91(6):1277–81.
59. Requena-Méndez A, Aldasoro E, De Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, et al. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015 Feb 13;9(2):e0003540.
60. Rodrigues Coura J, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 2014;109(7):856–62.
61. Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, et al. Congenital chagas disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(10):4–6.
62. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the Congenital Transmission of *Trypanosoma cruzi*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *BJOG*. 2014 January ; 121(1): 22–33
63. Basile L, Ciruela P, Requena-Méndez A, Vidal J, Dopico E, Martín-Nalda A, et al. Epidemiology of congenital Chagas disease 6 years after implementation of a public health surveillance system, Catalonia, 2010 to 2015. *Euro Surveill* 2019;24(26)
64. Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, Martín-Nalda A, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: Evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg*. 2012;87(5):832–6.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

65. Sosa-Estani S, Cura E, Velazquez E, Yampotis C, Segura EL. Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009;42(5):484–487.
66. Protocolo de cribado, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y en sus hijos. Available from: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/_AZ/C/chagas/documents/arxiu/protcolcribratgeidiagnostic_cast.pdf
67. Enfermedad de Chagas Importada: protocolo de actuación en la Comunitat Valenciana. <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/V-5243-2008.pdf>
68. Protocolo de cribado da enfermidade de Chagas en mulleres embarazadas [https://www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Documents/650/Protocolo de cribado da enfermidade de Chagas en mulleres embarazadas.pdf](https://www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Documents/650/Protocolo%20de%20cribado%20da%20enfermidade%20de%20Chagas%20en%20mulleres%20embarzadas.pdf)
69. Basile L, Oliveira I, Ciruela P, Plasencia A. The current screening programme for congenital transmission of chagas disease in Catalonia, Spain. *Eurosurveillance.* 2011;16(38):1–6.
70. Piron M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *TRANSFUSION* 2008;48:1862-1868
71. Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the Blood Supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):12–29.
72. Len O, Garzoni C, Lumbreras C, Molina I, Meije Y, Pahissa A, et al. Recommendations for screening of donor and recipient prior to solid organ transplantation and to minimize transmission of donor-derived infections Hot topics. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20:10–8.
73. Montero M, Mir M, Sulleiro E, Avalos Esquivel JL, García López E, Molina-Morant D, et al. High-dose benznidazole in a 62-year-old Bolivian kidney transplant recipient with Chagas central nervous system involvement. *International Journal of Infectious Diseases* 78 (2019) 103–106 Contents
74. Goterris L, Bocanegra C, Serre-Delcor N, Moure Z, Treviño B, Zarzuela F, et al. El cribado de las enfermedades parasitarias en la población inmigrante asintomática. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016 Jul;34:25–31.
75. Greenaway C, Castelli F. Infectious diseases at different stages of migration: an expert review. *J Travel Med.* 2019;1–10.
76. Requena-Méndez A, Bussion S, Aldasoro E, Jackson Y, Angheben A, Moore D, et al. Cost-effectiveness of Chagas disease screening in Latin American migrants at primary health-care centres in Europe: a Markov model analysis. *Lancet Glob Health* 2017; 5: e439–47
77. Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben a, Bartoloni a, et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill.* 2011;16:1–10.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

78. Requena-Mé Ndez A, Albajar-Viñ As P, Angheben A, Chiodini P, Gascó J, Muñ Oz J, et al. Policy Platform Health Policies to Control Chagas Disease Transmission in European Countries. *PLoS Negl Trop Dis* 8(10): e3245.
79. Ribera E, Crespo M, Falcó V, Curran A, Salvador F, Ocaña I, et al. Tropical Diseases Screening in Immigrant Patients with Human Immunodeficiency Virus Infection in Spain. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2013;88(6):1196–202.
80. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Ruiz-Camps I, Barba P, Valcárcel D, Sulleiro E, et al. Imported disease screening prior to chemotherapy and bone marrow transplantation for oncohematological malignancies. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;95(6):1463–8.
81. Gómez i Prat J, Peremiquel-Trillas P, Claveria Guiu I, Choque E, Oliveira Souto I, Serre Delcor N, et al. A Community-Based Intervention for the Detection of Chagas Disease in Barcelona, Spain. *J Community Health* [Internet]. 2019;44(4):704–11.
82. Ouaraab Essadek H, Claveria Guiu I, Caro Mendivelso J, Sulleiro E, Pastoret C, Navarro M, et al. Cribado in situ de la enfermedad de Chagas con una intervención comunitaria: ¿puede mejorar la accesibilidad al diagnóstico y al tratamiento? *Gac Sanit* [Internet]. 2017;31(5):439–40.
83. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral Transmission of Chagas Disease. *Clin Infect Dis* 2012 Mar;54(6):845–52.
84. Viotti R, Alarcón De Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, et al. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014; 58 (2): 635–639
85. Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop*. 2010;115:55–68.
86. Tarleton RL, Schofield L, Pearce E. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi* This review comes from a themed issue on Host-pathogen interactions Edited. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2007;19:430–4.
87. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease *Parasite Immunol*. 2014 August ; 36(8): 377–387
88. Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezos J, Soriano A, Serre N, Gómez I Prat J, Pahissa A MI. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(7):706.
89. Bocchi A, Bestetti RB, Scanavacca MI, Neto EC, Issa VS. Chronic Chagas Heart Disease Management From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. *J Am Coll Cardiol*. 2017 Sep 19;70(12):1510-1524
90. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, et al. Chagas Cardiomyopathy: Usefulness of EKG and Echocardiogram in a Non-Endemic Country. *PLoS ONE* 2016; 11(6): e0157597.
91. Sánchez-Montalvá A, Moris M, Mego M, Salvador F, Accarino A, Ramírez K, et

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- al. High Resolution Esophageal Manometry in Patients with Chagas Disease: A Cross-Sectional Evaluation. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10(2): e0004416
92. Salvador F, Mego M, Sánchez-Montalvá A, Morís M, Ramírez K, Accarino A, et al. Assessment of Rectocolonic Morphology and Function in Patients with Chagas Disease in Barcelona (Spain). *Am J Trop Med Hyg.* 2015;92(5):898–902.
 93. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Valerio L, Serre N, Roure S, Treviño B, et al. Immunosuppression and Chagas disease; experience from a non-endemic country. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21:854–60.
 94. Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007;25:29–37.
 95. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 1983;18(2):327–30.
 96. Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* [Internet]. 1962 Feb;48:100.
 97. Riera. C. Diagnóstico de laboratorio de la Enfermedad de Chagas. *Ed Cont Lab Clín; 16 82 - 92.* 2013;109–18.
 98. Portela-Lindoso AB e Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saúde Pública* 2003;37(1)107-15
 99. Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M y Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl 1):26–34.
 100. Flores-Chavez M, Bosseno M-F, Bastrenta B, Dalenz J-LA, Hontebeyrie M, Revollo S, et al. Polymerase chain reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in Bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75(3):497–501.
 101. World Health Organization. Control of Chagas Disease second report of the who expert committee world health organization. *w h o t e c h n i c a l r e p o r t s e r i e s.* 2002;905:1–109.
 102. Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez-Alquezar A, Umezawa ES. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Aug;14(8):1045–9.
 103. Franco Da Silveira J, Setsu Umezawa E, Luquetti AO. Review Review Chagas disease affects around 12 million people in the [Internet]. Vol. 17, *TRENDS in Parasitology* 2001; 17(6):286-291
 104. Flores-Chavez M, Cruz I, Nieto J, Gárate T, Navarro M, Pérez-Ayala A, et al. Sensitivity and Specificity of an Operon Immunochromatographic Test in Serum and Whole-Blood Samples for the Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in

- Spain, an Area of Nonendemicity. *Clinical and Vaccine Immunology* 2012; 19(9):1353–1359
105. Remesar MC, Gamba C, Colaianni IF, Puppo M, Sartor PA, Murphy EL, et al. Estimation of sensitivity and specificity of several *Trypanosoma cruzi* antibody assays in blood donors in Argentina. *Transfusion*. 2009;49(11):2352–8.
 106. Flores-Chavez MD, Sambri V, Schottstedt V, Higuera-Escalante FA, Roessler D, Chaves M, et al. Evaluation of the elecsys chagas assay for detection of *trypanosoma cruzi*-specific antibodies in a multicenter study in Europe and Latin America. *J Clin Microbiol*. 2018;56(5).
 107. Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, et al. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a change? *J Clin Microbiol*. 2016 Apr;JCM.00142-16.
 108. Pérez-Ayala A, Fradejas I, Rebollo L, Lora-Pablos D, Lizasoain M, Herrero-Martínez JM. Usefulness of the ARCHITECT Chagas® assay as a single test for the diagnosis of chronic Chagas disease. *Trop Med Int Heal TM IH*. 2018 Jun;23(6):634–40.
 109. Noazin S, Lee JA, Malaga ES, Valencia Ayala E, Condori BJ, Roca C, et al. Trypomastigote Excretory Secretory Antigen Blot Is Associated With *Trypanosoma cruzi* Load and Detects Congenital *T. cruzi* Infection in Neonates, Using Anti-Shed Acute Phase Antigen Immunoglobulin M. *The Journal of Infectious Diseases* 2019;219:609–18
 110. Niborski LL, Grippo V, Lafón SO, Levitus G, García-Bournissen F, Ramirez JC, et al. Serological based monitoring of a cohort of patients with chronic chagas disease treated with benznidazole in a highly endemic area of Northern Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(6):365–71.
 111. Muñoz G, Vergara C, Martínez G, Apt W, Zulantay I. Quantification of Immunoglobulin G against *Trypanosoma cruzi* in Individuals with Chronic Chagas Disease Treated with Nifurtimox and Evaluated in Prolonged Follow-Up. 2019;57(1):39–41.
 112. Moscatelli G, Moroni S, Garcia Bournissen F, Gonzalez N, Ballering G, Schijman A et al. Longitudinal follow up of serological response in children treated for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 13(8) e0007668. 2019;1–14.
 113. Lapa JS, Saraiva RM, Hasslocher-Moreno AM, Georg I, Souza AS, Xavier SS, et al. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jun;31(6):965–74.
 114. Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, et al. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion*. 1993 Oct;33(10):830–4.
 115. Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, Nunes E V., et al. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Int Heal*. 2008 Dec;13(12):1527–33.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

116. Moure Z, Angheben A, Molina I, Gobbi F, Espasa M, Anselmi M, et al. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(9):788–92.
117. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC V, et al. Immunoblot Assay Using Excreted-Secreted Antigens of *Trypanosoma cruzi* in Serodiagnosis of Congenital, Acute, and Chronic Chagas' Disease. Vol. 34, *Journal of Clinical Microbiology.* 1996
118. Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, et al. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang.* 2004;87(3):204–207.
119. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, et al. Short report: Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;86(3):412–6.
120. Moure Z, Sulleiro E, Iniesta L, Guillen C, Molina I, Alcover MM, et al. The challenge of discordant serology in Chagas disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases. *Acta Trop.* 2018;185(February):144–8.
121. Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):639–42.
122. Saez-Alquézar A, Sabino EC, Salles N, Chamone DF, Hulstaert F, Pottel H, et al. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J Clin Microbiol.* 2000;38(2):851–4.
123. Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, Degrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(9):2421–6.
124. Moser DR, Kirchhoff L V, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27(7):1477.
125. Britto C1, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM WP. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitol* 1995 Apr;110 (Pt 3)241-7. 1995;
126. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2018;184:59–66.
127. Tarleton RL, Zhang L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol today.* 1999;15(3):94–99.
128. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain

- reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.* 1991;48(2):211–21.
129. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(1).
 130. Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, Gascon J. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev Mol Diagn.* 2017;17(7):699–710.
 131. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3(4).
 132. Carlos Ramírez J, Inés Cura C, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients HHS Public Access. *J Mol Diagn.* 2015;17(5):605–15.
 133. Ramírez JC, da Cruz Moreira O. Assessing Parasite Load in Chagas Disease Patients by Quantitative Multiplex Real-Time PCR. En: *T. cruzi Infection: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology.* 2019: 215-225
 134. Ramirez JC, Parrado R, Sulleiro E, de la Barra A, Rodriguez M, Villarroel S, et al. First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease. *PLoS One.* 2017;12(11):e0188550.
 135. Seiringer P, Pritsch M, Flores-Chavez M, Marchisio E, Helfrich K, Mengele C, et al. Comparison of four PCR methods for efficient detection of *Trypanosoma cruzi* in routine diagnostics. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017 Jul;88(3):225–32.
 136. Parrado R, Carlos Ramirez J, de la Barra A, Alonso-Vega C, Ortiz L, Illanes D, et al. Usefulness of Serial Blood Sampling and PCR Replicates for Treatment Monitoring of Patients with Chronic Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019 Jan 29;63(2).
 137. Abras A, Ballart C, Llovet T, Roig C, Gutiérrez C, Tebar S, et al. Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: A comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. *PLoS ONE* 2018;13(4): e0195738
 138. Ramírez JC, Torres C, Curto M de los A, Schijman AG. New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Dec 18;11(12):e0006139.
 139. Thekisoe OMM, Rambritch NE, Nakao R, Bazie RS, Mbatia P, Namangala B, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection of *Theileria parva* infections targeting the PIM and p150 genes. *International Journal for Parasitology* 40 (2010) 55–61 Contents

CITAS BIBLIOGRAFICAS

140. Rivero R, Bisio M, Beatriz Velázquez E, Inés Esteva M, Scollo K, Leonel González N, et al. Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of congenital Chagas infection. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2017; (89): 26–28
141. Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz Mata I, Picado de Puig A, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(7).
142. Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: Insight gained in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(SUPPL. 1):167–80.
143. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295–306.
144. Cardoso CS, Ribeiro ALP, Oliveira CDL, Oliveira L, Ferreira AM B AL, Silva JL CE, Ferreira JE, Lee Tzong-Hae, Busch MP, Reingold AL, et al. Beneficial effects of benznidazole in Chagas disease: NIH SaMi-Trop cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 12(11) e0006814. 2018;
145. Sulleiro E, Muñoz-Calderon A, Schijman AG. Title: Role of Nucleic Acid Amplification assays in monitoring treatment response in Chagas disease: Usefulness in clinical trials. *Acta Tropica* 2019; 199: 105-120
146. Carranza JC, Valadares HMS, D'ávila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão MC, et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol*. 39:963–73.
147. Rodrigues-dos-Santos caro I, Melo MF, de Castro L, Marcel Hasslocher-Moreno A, Emmanuel A do Brasil PA, Silvestre de Sousa A, et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2018; 12(11): e0006939
148. Muñoz-Calderón A, Santaniello A, Pereira A, Yannuzzi J, Díaz-Bello Z A de NB. Susceptibilidad in vitro a nifurtimox y benznidazol de aislados de *Trypanosoma cruzi* obtenidos de pacientes venezolanos con enfermedad de Chagas infectados por mecanismos de transmisión oral y vectorial. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 7114–22. 2012
149. Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZMP, et al. Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of *Trypanosoma cruzi* *The Journal of Infectious Diseases* 2000;182:634–8
150. Galvão LMC, Chiari E, Macedo AM, Luquetti AO, Silva SA, Lúcia A, et al. PCR Assay for Monitoring *Trypanosoma cruzi* Parasitemia in Childhood after Specific Chemotherapy. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2003;41(11):5066–70.
151. Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel M, Yampotis C.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. Vol. 59, Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998
152. Sales Junior PA, Molina I, Fonseca Murta SM, An S ´ Anchez-Montalvá A, Montalvá M, Salvador F, et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. Am J Trop Med Hyg. 2017;97(5):1289–303.
 153. Dias JCP. Chagas disease (American trypanosomiasis). In: Arthropod Borne Diseases. 2016.
 154. Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M AN. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe City (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution Tratamiento. J Rev Soc Bras Med Trop 2007 Jan-Feb;40(1)1-10. 2007;
 155. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Avilés AS, et al. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. Antimicrob Agents Chemother 2015; 59:6125–6131
 156. Gomes YM, Lorena V, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:115–121.
 157. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(SUPPL. 1):122–35.
 158. Pinazo M-J, Thomas M-C, Bustamante J, Almeida IC de, Lopez M-C, Gascon J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(3):422–32.
 159. Sguassero Y, Cuesta CB, Roberts KN, Hicks E, Comandé D, Ciapponi A, et al. Course of chronic *Trypanosoma cruzi* infection after treatment based on parasitological and serological tests: A systematic review of follow-up studies. Vol. 10, PLoS ONE. 2015.
 160. Villar JC, Villar LA, Marin-Neto JA, Ebrahim S, Yusuf S. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. Cochrane Database Syst Rev. 2003;(5).
 161. Perez-Molina JA, Perez-Ayala A, Moreno S, Fernandez-Gonzalez MC, Zamora J, Lopez-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. J Antimicrob Chemother [Internet]. 2009;64(6):1139–47.
 162. Urbina JA. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. Journal of Eukaryotic Microbiology 2015, 62, 149–156
 163. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Artaza MA, Moreno R, Perin L, et al. Pharmacokinetics of Benznidazole in Healthy Volunteers and Implications in Future Clinical Trials. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61:e01912-16.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

164. Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. [Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy]. *Arq Bras Cardiol*. 1985 Oct;45(4):249–56.
165. De Rezende J, Lauer KM, De Oliveira A. Clinical and radiological aspects of aperistalsis of the esophagus. *Rev Bras Gastroenterol*;12:247–62.
166. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2014;370(20):1899–908.
167. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007;103(3):195–200.
168. Valerio-Sallent L, Roure S, Basile L, Ballesteros LA, Sabrià M, Rodrigo C, et al. Un estudio clínico-epidemiológico de la población infectada por *Trypanosoma cruzi* en la zona metropolitana norte de Barcelona. *Rev Clínica Española*. 2012 Jul [cited 2019 Aug 29];212(7):329–36.
169. Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Giménez F, Treviño B, López-Chejade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: Immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 111 51–55. 2009;38(3):447–62
170. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Navarro M, Monge-Maillo B, Díaz-Menéndez M, et al. Chagas disease in Latin American migrants: A Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(7):1108–13.
171. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: A prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1759–64.
172. Norman FF, Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Flores-Chavez M, Cañavate C, López-Vélez R. Lack of association between blood-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA and cardiac involvement in a non-endemic area. *Ann Trop Med Parasitol*. 2011;105(6):425–30.
173. Ramos JM, Torrús D, Amador C, Jover F, Pérez-Chacón F, Ponce Y, et al. Multicenter epidemiological and clinical study on imported Chagas diseases in Alicante, Spain. *Pathog Glob Health*. 2012;106(6):340–5.
174. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop*. 2013;125(1):23–31.
175. Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Carlos Ramírez J, Cura CI, et al. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitol Int*. 2016;66:83–8.
176. Perez-Molina JA, Poveda C, Martinez-Perez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno

- M, et al. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2014;21:440–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.018>
177. A L Basquiera, A Sembaj, A M Aguerri, M Omelianiuk, S Guzmán JMB, T F Caeiro, R J Madoery OAS. Risk progression to chronic Chagas cardiomyopathy: influence of male sex and of parasitaemia detected by polymerase chain reaction. *Hear* 2003;891186–1190.
 178. Chammartin F, Scholte RGC, Guimarães LH, Tanner M, Utzinger J, Vounatsou P. Articles Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 507–18 Published
 179. Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Gobbi F, et al. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. *Epidemiol. Infect.* 2015; 143, 452–460.
 180. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Carrillo E, Molina I. Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10 (4): e0004663
 181. Salvador F, Sulleiro E, Piron M, An S Anchez-Montalv A, Sauleda S, Molina-Morant D, et al. *Strongyloides stercoralis* infection increases the likelihood to detect *Trypanosoma cruzi* DNA in peripheral blood in Chagas disease patients. *Tropical Medicine and International Health.* 2017; 22 (11): 1436–1441
 182. Caradonna KL, Engel JC, Jacobi D, Lee C-H, Burleigh BA. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe.* 2013 January 16; 13(1): 108–117
 183. Teotônio I, Dias N, Hagström-Bex L, Nitz N, Francisco AF HM. Intestinal microbiota – A modulator of the *Trypanosoma cruzi*-vector-host triad. *Microb Pathog.* 2019 Sep 3:103711
 184. Teixeira MM, Gazzinelli RT, Silva JS. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends in Parasitology.* 2002. Vol. 18, p. 262–5.
 185. Espinosa-Pereiro J, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Sao-Avilés A, Sulleiro E, Molina I. A retrospective study on the influence of siblings' relatedness in Bolivian patients with chronic Chagas disease. *Parasit Vectors* [Internet]. 2019;12(1):260.
 186. Acosta-Herrera M SM, Casares-Marfil D MJ, Chagas Genetics CYTED Network. Genomic medicine in Chagas disease. *Acta Trop* 197
 187. Murcia L, Carrilero B, Ferrer F, Roig M, Franco F, Segovia M. Success of benznidazole chemotherapy in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected patients with a sustained negative PCR result. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(11):1819–27.
 188. Chatelain E. Chagas Disease Drug Discovery. *J Biomol Screen.* 2014 Sep 23;20(1):22–35.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

189. Jackson Y, Chatelain E, Mauris A, Holst M, Miao Q, Chappuis F, et al. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13(1):1.
190. Vergara C, Muñoz G, Martínez G, Apt W, Zulantay II. Detection of *Trypanosoma cruzi* by PCR in adults with chronic Chagas disease treated with nifurtimox. *PLoS ONE* 2019;14(8): e0221100
191. Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, et al. Parasite Persistence in Treated Chagasic Patients Revealed by Xenodiagnosis and Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(6):823–6.
192. Álvarez MG, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JC, et al. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016 Feb 1;60(2):833–7.
193. Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. Activities of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) against Drug-Resistant Strains of the Protozoan Parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. *AAC*, 2000; 44(1):150–155
194. Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Andrei' A, Liendo A, Sanoja C, et al. Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of SCH 56592 against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: In Vitro and In Vivo Studies [Internet]. Vol. 42. 1998
195. Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, Hachem R, Kontoyiannis DP, Töpelt K, et al. Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Posaconazole in Patients with Persistent Febrile Neutropenia or Refractory Invasive Fungal Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(2):658–66.
196. Mellinghoff SC, Panse J, Alakel N, Behre G, Buchheidt D, Christopeit M, et al. Primary prophylaxis of invasive fungal infections in patients with haematological malignancies: 2017 update of the recommendations of the Infectious Diseases Working Party (AGIHO) of the German Society for Haematology and Medical Oncology (DGHO). *Annals of Hematology* (2018) 97:197–207
197. Brandon S. Walker¹ | Robert L. Schmidt^{1,2} | Srinivas Tantravahi³ | Kibum Kim² |, Kimberly E. Hanson^{1,2,4}. Cost-effectiveness of antifungal prophylaxis, preemptive therapy, or empiric treatment following allogeneic hematopoietic stem cell transplant. *Transpl Infect Dis*. 2019 Jul 20:e13148
198. Maldonado, RA, Molina, J, Payares G, Urbina JA. Experimental Chemotherapy with Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors in Murine Models of Chagas' Disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37(6): 1353-1359
199. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol*. 2017;69(8):939–47.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

200. Torrico F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-Vega C, Pinazo MJ, Schijman A, Almeida IC, Alves F, Strub-Wourgaft N, Ribeiro I on behalf of the ESG. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;18:419–49.
201. Sosa-Estani S, Viotti R, Segura EL. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina . *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 104(Suppl. I): 167-180, 2009
202. Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - Evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol*. 2005;5:1–13.
203. Domingo C, Niedrig M, Teichmann A, Kaiser M, Rumer L, Jarman RG, et al. 2Nd International External Quality Control Assessment for the Molecular Diagnosis of Dengue Infections. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(10).
204. Murphy SC, Hermsen CC, Douglas AD, Edwards NJ, Petersen I, Fahle GA, et al. External Quality Assurance of Malaria Nucleic Acid Testing for Clinical Trials and Eradication Surveillance. Kumar S, editor. *PLoS One*. 2014 May 16;9(5):e97398.
205. Cruz I, Millet A, Carrillo E, Chenik M, Salotra P, Verma S, et al. An approach for interlaboratory comparison of conventional and real-time PCR assays for diagnosis of human leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 134 (2013) 281–289 Contents
206. Egui A, Carmen Thomas M, Fernandez-Villegas A, Pérez-Antón E, Gómez I, Carrilero B, et al. A parasite biomarker set for evaluating benznidazole treatment efficacy in 1 patients with chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Jul 29. pii: AAC.02436-18
207. Fernandez-Villegas A, Thomas MC, Carrilero B, Lasso P, Egui A, Murcia L, et al. A 12-mer repetitive antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* is a potential marker of therapeutic efficacy in chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(7):2005–9.
208. Angheben A, Buonfrate D, Cruciani M, Id YJ, Alonso-Padilla Id J, et al. Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2019; 13(5)
209. Ramírez JC, Torres C, De Los M, Curto A, Schijman AG. New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11(12): e0006139.
210. Murta SMF, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FFM, Probst CM, Ávila AR, et al. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2006 Apr;146(2):151–62.
211. Sáez-Alquizar A, Murta M, Marques WP, Silva GR da. Resultados de un programa de control de calidad externo del tamizaje serológico de anticuerpos

CITAS BIBLIOGRAFICAS

contra Trypanosoma cruzi en donantes de sangre de Brasil. Rev Panam Salud Pública. 2003 Mar;13(2-3):129-37.

ANEXOS

11. ANEXOS

11.1. Publicaciones basadas en los resultados de esta Tesis

1. Role of Nucleic Acid Amplification assays in monitoring treatment response in Chagas disease: Usefulness in clinical trials.

Sulleiro E, Muñoz-Calderon A, Schijman AG. Acta Trop. 2019 Jul 31:105120.

Acta Tropica 199 (2019) 105120



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Role of nucleic acid amplification assays in monitoring treatment response in chagas disease: Usefulness in clinical trials

Elena Sulleiro^a, AQRturo Muñoz-Calderon^b, Alejandro G. Schijman^{b,*}



^a Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, P^o Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain
^b Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Hector Torres" (INGEBI-CONICET), Vuelta de Obligado 2490; Second Floor, Ciudad de Buenos Aires, ZIP code 1428 Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:
Trypanosoma cruzi
 Chronic chagas disease
 Quantitative real time PCR
 Clinical trials
 Treatment monitoring
 Drug resistance

ABSTRACT

Chagas disease has become a global health problem due to migration of infected people out of Latin America to non-endemic countries. For more than 40 years, only the nitroimidazole compounds Benznidazole and Nifurtimox, have been used for specific treatment of *Trypanosoma cruzi* infection with disappointing results, specially due to the long duration of treatment and adverse events in the chronic phase. In the last years, ergosterol inhibitors have been also proposed for specific treatment. Different randomized clinical trials were performed for evaluating their treatment efficacy and safety.

One of the greatest concerns in clinical trials is to provide an early surrogate biomarker of response to trypanocidal chemotherapy. Serological response is slow and the classical parasitological tests have poor sensitivity and are time-consuming. Nowadays, PCR is the most helpful tool for assessing treatment response in a short period of time. Different protocols of PCR have been developed, being quantitative real time PCR based on amplification of repetitive satellite or minicircle DNA sequences plus an internal amplification standard, the mostly employed strategies in clinical trials. Standardized protocols and the use of an external quality assessment ensure adequate technical procedures and reliable data.

Clinical trials have shown a significant reduction in parasite loads, reaching undetectable DNA levels in bloodstream after specific treatment, however events of treatment failure have also been reported.

Treatment failure could be due to inadequate penetrance of the drugs into the affected tissues, to the presence of primary or secondary drug resistance of the infecting strains as well as to the existence of dormant parasite variants reluctant to drug action.

The early diagnosis of drug resistance would improve clinical management of Chagas disease patients, allowing dictating alternative therapies with a combination of existing drugs or new anti-*T. cruzi* agents.

The aim of this review was to describe the usefulness of detecting *T. cruzi* DNA by means of real time PCR assays, as surrogate biomarker in clinical trials for evaluating new drugs for CD or new regimens of available drugs and the possibility to detect treatment failure.

1. Introduction

Chagas disease (CD), caused by the kinetoplastid flagellate *Trypanosoma cruzi*, has been considered as "the most neglected of the neglected diseases" with research and development gaps related to diagnosis and treatment. Although CD has by tradition been treated as an endemic disease in the tropical and subtropical areas of South America, it has become a global concern due to migration of infected people to non-endemic countries. Complex interactions between the parasite and the mammalian host, as well as eco-epidemiological factors determine the infection outcome.

The infection passes through an acute and a chronic phase. During the acute phase, symptoms are variable and mostly decline spontaneously after weeks. Appropriate parasitological treatment can eradicate the parasite. In the chronic phase, approximately 70% of seropositive individuals are asymptomatic, whereas 30% develop cardiac and/ or digestive disease manifestations several years or decades later; out of them, 2–3% present severe forms that can evolve to sudden death. The factors governing the progression of chronic Chagas disease remain unknown and no prognostic markers are still available (Pérez-Molina and Molina, 2018).

* Corresponding author.
E-mail addresses: esulleir@vhebron.net (E. Sulleiro), amunoz@dna.uba.ar (A. Muñoz-Calderon), schijman@dna.uba.ar (A.G. Schijman).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105120>
 Received 26 March 2019; Received in revised form 23 July 2019; Accepted 30 July 2019
 Available online 31 July 2019
 0001-706X/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

2. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, **Sulleiro E**, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A.

N Engl J Med. 2014 May 15;370(20):1899-908.

THE NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE

ORIGINAL ARTICLE

Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease

Israel Molina, M.D., Jordi Gómez i Prat, M.D., Fernando Salvador, M.D., Begoña Treviño, M.D., Elena Sulleiro, M.D., Núria Serre, M.D., Diana Pou, M.D., Sílvia Roure, M.D., Juan Cabezos, M.D., Lluís Valerio, Ph.D., Albert Blanco-Grau, M.D., Adrián Sánchez-Montalvá, M.D., Xavier Vidal, Ph.D., and Albert Pahissa, Ph.D.

ABSTRACT

BACKGROUND
Current therapeutic options for Chagas' disease are limited to benznidazole and nifurtimox, which have been associated with low cure rates in the chronic stage of the disease and which have considerable toxicity. Posaconazole has shown trypanocidal activity in murine models.

METHODS
We performed a prospective, randomized clinical trial to assess the efficacy and safety of posaconazole as compared with the efficacy and safety of benznidazole in adults with chronic *Trypanosoma cruzi* infection. We randomly assigned patients to receive posaconazole at a dose of 400 mg twice daily (high-dose posaconazole), posaconazole at a dose of 100 mg twice daily (low-dose posaconazole), or benznidazole at a dose of 150 mg twice daily; all the study drugs were administered for 60 days. We assessed antiparasitic activity by testing for the presence of *T. cruzi* DNA, using real-time polymerase-chain-reaction (rt-PCR) assays, during the treatment period and 10 months after the end of treatment. Posaconazole absorption was assessed on day 14.

RESULTS
The intention-to-treat population included 78 patients. During the treatment period, all the patients tested negative for *T. cruzi* DNA on rt-PCR assay beyond day 14, except for 2 patients in the low-dose posaconazole group who tested positive on day 60. During the follow-up period, in the intention-to-treat analysis, 92% of the patients receiving low-dose posaconazole and 81% receiving high-dose posaconazole, as compared with 38% receiving benznidazole, tested positive for *T. cruzi* DNA on rt-PCR assay ($P < 0.01$ for the comparison of the benznidazole group with either posaconazole group); in the per-protocol analysis, 90% of the patients receiving low-dose posaconazole and 80% of those receiving high-dose posaconazole, as compared with 6% receiving benznidazole, tested positive on rt-PCR assay ($P < 0.001$ for the comparison of the benznidazole group with either posaconazole group). In the benznidazole group, treatment was discontinued in 5 patients because of severe cutaneous reactions; in the posaconazole groups, 4 patients had aminotransferase levels that were more than 3 times the upper limit of the normal range, but there were no discontinuations of treatment.

CONCLUSIONS
Posaconazole showed antitypanosomal activity in patients with chronic Chagas' disease. However, significantly more patients in the posaconazole groups than in the benznidazole group had treatment failure during follow-up. (Funded by the Ministry of Health, Spain; CHAGASAZOL ClinicalTrials.gov number, NCT01162967.)

From the Infectious Disease Department (I.M., F.S., A.S.-M., A.P.), Microbiology Department (E.S.), the Drug Monitoring Unit, Clinical Laboratory (A.B.-G.), and the Clinical Pharmacology Service (X.V.), Vall d'Hebron Teaching Hospital, Special Program for Infectious Diseases, Vall d'Hebron Drassanes (J.G.P., B.T., N.S., D.P., J.C.), International Health Program of the Catalan Institute of Health (PROSICS) Barcelona (I.M., J.G.P., F.S., B.T., E.S., N.S., D.P., J.C., A.S.-M., A.P.), International Health Unit Metropolitana Nord, Infectious Disease Unit, Internal Medicine Department, Germans Trias i Pujol Teaching Hospital (S.R.), and International Health Unit Metropolitana Nord (L.V.), PROSICS Metropolitana Nord, and the Department of Pharmacology, Therapeutics, and Toxicology, Universitat Autònoma de Barcelona, and Fundació Institut Català de Farmacologia, WHO Collaborating Center for Research and Training in Pharmacoepidemiology (X.V.)—all in Barcelona. Address reprint requests to Dr. Molina at the Infectious Disease Department, Vall d'Hebron Teaching Hospital, PROSICS Barcelona, P^o Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain, or at imolina@vhebron.net.

N Engl J Med 2014;370:1899-908.
DOI: 10.1056/NEJMoa1313122
Copyright © 2014 Massachusetts Medical Society.

N ENGL J MED 370;20 NEJM.ORG MAY 15, 2014

1899

3. First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease.

Ramírez JC, Parrado R, **Sulleiro E**, de la Barra A, Rodríguez M, Villarroel S, Irazu L, Alonso-Vega C, Alves F, Curto MA, García L, Ortiz L, Torrico F, Gascón J, Flevaud L, Molina I, Ribeiro I, Schijman AG.

PLoS One. 2017 Nov 27;12(11):e0188550.





Check for updates

RESEARCH ARTICLE

First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease

Juan C. Ramírez¹, Rudy Parrado², Elena Sulleiro³, Anabelle de la Barra², Marcelo Rodríguez⁴, Sandro Villarroel², Lucía Irazu⁴, Cristina Alonso-Vega⁵, Fabiana Alves⁵, María A. Curto¹, Lineth García², Lourdes Ortiz⁶, Faustino Torrico⁷, Joaquim Gascón⁸, Laurence Flevaud⁹, Israel Molina⁹, Isabela Ribeiro⁹, Alejandro G. Schijman^{1*}

1 Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres" (INGEBI-COMICET), Buenos Aires, Argentina, 2 Instituto de Investigaciones Biomédicas (IBIMED), Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia, 3 Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain, 4 Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI)-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", Buenos Aires, Argentina, 5 Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDI), Geneva, Switzerland, 6 Universidad Autónoma Juan Misael Saracho, Tarija, Bolivia, 7 Fundación CEADES, Cochabamba, Bolivia, 8 ISGbbat, Barcelona Centre for International Health Research (CRE-SIB), Hospital Clínic-Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, 9 Midecins Sans Frontières Operational Center Barcelona-Athens (OCBA), Barcelona, Spain

* schijman@dna.uba.ar

OPEN ACCESS

Citation: Ramírez JC, Parrado R, Sulleiro E, de la Barra A, Rodríguez M, Villarroel S, et al. (2017) First external quality assurance program for bloodstream Real-Time PCR monitoring of treatment response in clinical trials of Chagas disease. PLoS ONE 12(11): e0188550. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188550>

Editor: Xiang Li, Janssen Research and Development, UNITED STATES

Received: February 22, 2017

Accepted: November 9, 2017

Published: November 27, 2017

Copyright: ©2017 Ramírez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its supporting information files.

Funding: This work was supported by Drugs for Neglected Diseases initiative and by the National Agency of Science, Technology and Productive Innovation grants PICT 2011-0207 and PICT 2014-0267. The EQA evaluation for the two DNDI-sponsored clinical trials was funded through DNDI by the following donors: Strategic Transition

Abstract

Real-Time PCR (qPCR) testing is recommended as both a diagnostic and outcome measurement of etiological treatment in clinical practice and clinical trials of Chagas disease (CD), but no external quality assurance (EQA) program provides performance assessment of the assays in use. We implemented an EQA system to evaluate the performance of molecular biology laboratories involved in qPCR based follow-up in clinical trials of CD. An EQA program was devised for three clinical trials of CD: the E 1224 (NCT01489228), a pro-drug of ravuconazole; the Sampling Study (NCT01678599), that used benznidazole, both conducted in Bolivia; and the CHAGASAZOL (NCT01162967), that tested posaconazole, conducted in Spain. Four proficiency testing panels containing negative controls and sero-negative blood samples spiked with 1, 10 and 100 parasite equivalents (par. eq./mL) of four *Trypanosoma cruzi* stocks, were sent from the Core Lab in Argentina to the participating laboratories located in Bolivia and Spain. Panels were analyzed simultaneously, blinded to sample allocation, at 4-month intervals. In addition, 302 random blood samples from both trials carried out in Bolivia were sent to Core Lab for retesting analysis. The analysis of proficiency testing panels gave 100% of accordance (within laboratory agreement) and concordance (between laboratory agreement) for all *T. cruzi* stocks at 100 par. eq./mL; whereas their values ranged from 71 to 100% and from 62 to 100% at 1 and 10 par. eq./mL, respectively, depending on the *T. cruzi* stock. The results obtained after twelve months of preparation confirmed the stability of blood samples in guanidine-EDTA buffer. No significant differences were found between qPCR results from Bolivian laboratory and Core Lab for

PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188550> November 27, 2017

1 / 15

4. Usefulness of real-time PCR during follow-up of patients treated with Benznidazole for chronic Chagas disease: experience in two referral centers in Barcelona

Sulleiro E*, Silgado A, Serre-Delcor N, Salvador F, Moure Z, Sao-Aviles A, Oliveira I, Treviño B, Goterris L, Sánchez-Montalvá A, Pou D, Molina I, Pumarola T.

En revisión. Plos Neglected Tropical Diseases

1 **Title:** Usefulness of real-time PCR during follow-up of patients treated with
2 Benznidazole for chronic Chagas disease: experience in two referral centers in
3 Barcelona

4 **Running title:** Monitoring benznidazole treatment for chronic Chagas disease with
5 qPCR

6

7 **Authors:** Elena Sulleiro^{a*}, Aroa Silgado^a, Núria Serre-Delcor^b, Fernando Salvador^c,
8 Zaira Moure^a, Augusto Sao-Aviles^c, Inés Oliveira^b, Begoña Treviño^b, Lidia Goterris^a,
9 Adrián Sánchez-Montalvá^c, Diana Pou^b, Israel Molina^c, Tomàs Pumarola^a.

10

11 **Affiliations:** ^aDepartment of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital.
12 Universitat Autònoma de Barcelona PROSICS Barcelona. Spain ^bTropical Medicine
13 Unit Vall d'Hebron-Drassanes. Universitat Autònoma de Barcelona PROSICS
14 Barcelona. Spain ^cDepartment of Infectious Diseases, Universitat Autònoma de
15 Barcelona, Vall d'Hebron University Hospital. PROSICS Barcelona. Spain

16

17

18

19

20 ***Corresponding author:**

21 Elena Sulleiro

22 Department of Microbiology

23 Vall d'Hebron University Hospital. PROSICS Barcelona

24 P. Vall d'Hebron 119-129. 08035 Barcelona. Spain

25 Telephone number: +34696317052

26 Fax number: +34932746001

27 E-mail: esulleir@vhebron.net

5. Aportaciones de la PCR a tiempo real en la fase crónica de la enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento

Elena Sulleiro*, Fernando Salvador, Pablo Martínez de Salazar, Aroa Silgado, Núria Serre-Delcor, Inés Oliveira, Begoña Treviño, Adrián Sánchez- Montalvá, María Luisa Aznar, Lidia Goterris, Israel Molina, Tomàs Pumarola.

En revisión. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.

1 **Título:** Aportaciones de la PCR a tiempo real en la fase crónica de la enfermedad
2 de Chagas en ausencia de tratamiento

3

4 **Autores:** Elena Sulleiro^{a*}, Fernando Salvador^b, Pablo Martínez de Salazar,
5 Aroa Silgado^a, Núria Serre-Delcor^c, Inés Oliveira^b, Zaira Moure^a, Begoña Treviño^c,
6 Adrián Sánchez-Montalvá^b, María Luisa Aznar^b, Diana Pou^b, Lidia Goterris^a, Pau
7 Bosch-Nicolau^b, Israel Molina^b, Tomàs Pumarola^a.

8

9 **Afiliaciones:** ^aServicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron.
10 Universitat Autònoma de Barcelona. PROSICS Barcelona.

11 ^bServicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Vall d'Hebron.
12 Universitat Autònoma de Barcelona. PROSICS Barcelona.

13 ^c Unidad de Salud Internacional Vall d'Hebron-Drassanes. PROSICS Barcelona.
14 Universitat Autònoma de Barcelona

15

16

17

18

19

20

21 *** Autor para correspondencia:**

22 Elena Sulleiro

23 Departamento de Microbiología, Vall Hospital Universitario d'Hebron

24 Pº Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, España .

25 Correo electrónico: esulleir@vhebron.net

11.2. Otras publicaciones relacionadas

1. Epidemiology of congenital Chagas disease 6 years after implementation of a public health surveillance system, Catalonia, 2010 to 2015.
Basile L, Ciruela P, Requena-Méndez A, Vidal MJ, Dopico E, Martín-Nalda A, **Sulleiro E**, Gascon J, Jané M; The Working Group Of Congenital Chagas Disease In Catalonia.
Euro Surveill. 2019 Jun;24(26).
2. A Community-Based Intervention for the Detection of Chagas Disease in Barcelona, Spain.
Gómez I Prat J, Peremiquel-Trillas P, Claveria Guiu I, Choque E, Oliveira Souto I, Serre Delcor N, **Sulleiro E**, Espasa M, Pastoret C, de Los Santos JJ, Ouaraab H, Albajar Viñas P, Ascaso Terren C.
J Community Health. 2019 Aug;44(4):704-711.
3. A retrospective study on the influence of siblings' relatedness in Bolivian patients with chronic Chagas disease.
Espinosa-Pereiro J, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Sao-Avilés A, **Sulleiro E**, Molina I.
Parasit Vectors. 2019 May 24;12(1):260.
4. Immune reactivity to Trypanosoma cruzi chimeric proteins for Chagas disease diagnosis in immigrants living in a non-endemic setting.
Dopico E, Del-Rei RP, Espinoza B, Ubillos I, Zanchin NIT, **Sulleiro E**, Moure Z, Celedon PAF, Souza WV, da Silva ED, Gomes YM, Santos FLN.
BMC Infect Dis. 2019 Mar 12;19(1):251.

5. High-dose benznidazole in a 62-year-old Bolivian kidney transplant recipient with Chagas central nervous system involvement.

Montero M, Mir M, **Sulleiro E**, Avalos Esquivel JL, García López E, Molina-Morant D, López Montesinos I, Sorlí L, Veliz Espinosa G, Mouteis Oliva E, Crespo M, Monge I, Horcajada JP, Grau S, Pascual J.

Int J Infect Dis. 2019 Jan;78:103-106.

6. The challenge of discordant serology in Chagas disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases.

Moure Z, **Sulleiro E***, Iniesta L, Guillen C, Molina I, Alcover MM, Riera C, Pumarola T, Fisa R.

Acta Trop. 2018 Sep;185:144-148.

7. Prevalence of Chagas Disease among Solid Organ-Transplanted Patients in a Nonendemic Country.

Salvador F, Sánchez-Montalvá A, **Sulleiro E**, Moreso F, Berastegui C, Caralt M, Pinazo MJ, Moure Z, Los-Arcos I, Len O, Gavaldà J, Molina I.

Am J Trop Med Hyg. 2018 Mar;98(3):742-746.

8. Strongyloides stercoralis infection increases the likelihood to detect Trypanosoma cruzi DNA in peripheral blood in Chagas disease patients.

Salvador F, **Sulleiro E**, Piron M, Sánchez-Montalvá A, Sauleda S, Molina-Morant D, Moure Z, Molina I.

Trop Med Int Health. 2017 Nov;22(11):1436-1441.

9. Case Report: Successful Lung Transplantation from a Donor Seropositive for Trypanosoma cruzi Infection (Chagas Disease) to a Seronegative Recipient.

Salvador F, Sánchez-Montalvá A, **Sulleiro E**, Berastegui C, Jauregui A, Pont T, Los-Arcos I, Len O, Gavaldà J, Molina I.

Am J Trop Med Hyg. 2017 Oct;97(4):1147-1150.

10. On site-screening for Chagas disease supported by a community intervention: can it improve accessibility for diagnosis and treatment?

Ouaarab Essadek H, Claveria Guiu I, Caro Mendivelso J, **Sulleiro E**, Pastoret C, Navarro M, Barrabeig I, Gómez I Prat J.

Gac Sanit. 2017 Sep - Oct;31(5):439-440

11. Imported Disease Screening Prior to Chemotherapy and Bone Marrow Transplantation for Oncohematological Malignancies.

Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Ruiz-Camps I, Barba P, Valcárcel D, **Sulleiro E**, Sanz-García E, Molina I.

Am J Trop Med Hyg. 2016 Dec 7;95(6):1463-1468.

12. Screening of parasitic diseases in the asymptomatic immigrant population.

Goterris L, Bocanegra C, Serre-Delcor N, Moure Z, Treviño B, Zarzuela F, Espasa M, **Sulleiro E**.

Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016 Jul;34 Suppl 3:25-31.

13. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries.

Moure Z, Angheben A, Molina I, Gobbi F, Espasa M, Anselmi M, Salvador F, Tais S, Sánchez-Montalvá A, Pumarola T, Albajar-Viñas P, **Sulleiro E**.

Clin Microbiol Infect. 2016 Sep;22(9):788-792.

14. Chagas Cardiomyopathy: Usefulness of EKG and Echocardiogram in a Non-Endemic Country.
Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, **Sulleiro E**, Sao-Avilés A, Roure S, Valerio L, Evangelista A, Molina I.
PLoS One. 2016 Jun 16;11(6):e0157597.

15. Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients.
Salvador F, **Sulleiro E**, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Carrillo E, Molina I.
PLoS Negl Trop Dis. 2016 Apr 26;10(4):e0004663.

16. Immunosuppression and Chagas disease: experience from a non-endemic country.
Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Valerio L, Serre N, Roure S, Treviño B, Pou D, **Sulleiro E**, Bocanegra C, Molina I.
Clin Microbiol Infect. 2015 Sep;21(9):854-60.

17. Screening for imported diseases in an immigrant population: experience from a teaching hospital in Barcelona, Spain.
Bocanegra C, Salvador F, **Sulleiro E**, Sánchez-Montalvá A, Pahissa A, Molina I.
Am J Trop Med Hyg. 2014 Dec;91(6):1277-81.

18. Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile.
Salvador F, Treviño B, **Sulleiro E**, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezas J, Soriano A, Serre N, Gómez I Prat J, Pahissa A, Molina I.
Clin Microbiol Infect. 2014 Jul;20(7):706-12.

19. Tropical diseases screening in immigrant patients with human immunodeficiency virus infection in Spain.

Salvador F, Molina I, **Sulleiro E**, Burgos J, Curran A, Van den Eynde E, Villar del Saz S, Navarro J, Crespo M, Ocaña I, Ribera E, Falcó V, Pahissa A.

Am J Trop Med Hyg. 2013 Jun;88(6):1196-202.

20. Congenital transmission of Trypanosoma cruzi in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain.

Otero S, **Sulleiro E**, Molina I, Espiau M, Suy A, Martín-Nalda A, Figueras C.

Am J Trop Med Hyg. 2012 Nov;87(5):832-6.

21. Safety of liver transplantation with Chagas disease-seropositive donors for seronegative recipients.

Salvador F, Len O, Molina I, **Sulleiro E**, Sauleda S, Bilbao I, Castells L, Pont T, Gavaldà J, Pahissa A.

Liver Transpl. 2011 Nov;17(11):1304-8.

