



Trabajo Fin Máster

MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON BENZNIDAZOL EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS

María José Muñoz Dávila
Alicante, 2015



**“Monitorización de la respuesta al tratamiento
con benznidazol en pacientes con enfermedad de
Chagas”**

**Memoria presentada como trabajo fin de máster por
María José Muñoz Dávila**

**Dirigida por el Doctor Manuel Segovia Hernández y por la
Doctora Laura Murcia Flores**

Tutor: Félix Gutiérrez Rodero.

Alicante, 2015

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción.....	1
I.1. Etiología de la enfermedad de Chagas.....	1
I.2. Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	1
I.3. Patogenia de la enfermedad de Chagas.....	1
I.3.1. Aguda.....	1
I.3.2. Crónica.....	2
I.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas.....	2
I.5. Tratamiento de la enfermedad de Chagas.....	2
I.6. Prevención de la enfermedad de Chagas.....	3
II. Objetivos de este trabajo.....	3
III. Materiales y métodos.....	4
III.1. Manipulación del ADN.....	4
III.1.1. Aislamiento del ADN en sangre total periférica.....	4
III.1.2. Amplificación de ADN por PCR.....	4
III.1.3. Técnicas electroforéticas.....	5
III.2. Técnicas serológicas.....	5
III.2.1. IFI.....	5
III.2.2. ELISA.....	6
III.3. Tratamiento con benznidazol.....	6
III.4. Población a estudio.....	6
III.4.1. Clasificación forma clínica de la enfermedad.....	6
III.4.2. Cohorte del estudio.....	7
III.9. Análisis estadístico.....	9
III.12. Consideraciones éticas.....	9
IV. Resultados.....	9
IV.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR después del tratamiento con benznidazol.....	9

Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con EC

IV.2. Seguimiento de los niveles de anticuerpos después del tratamiento con benznidazol mediante serología convencional.....17

V. Discusión.....21

V.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante PCR.....21

V.2 Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante serología convencional.....24

VI. Conclusiones.....25



I. INTRODUCCIÓN

I.1. Etiología de la enfermedad de Chagas

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas. Se trata de un parásito protozoo hemoflagelado de la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* (Brener, 1973).

T. cruzi infecta animales tanto vertebrados como invertebrados durante estadios definidos de su ciclo de vida (Rassi *et al.*, 2010).

Se han descrito las siguientes formas de transmisión de la enfermedad de Chagas: vectorial, congénita, transfusional, donación de órganos y oral.

I.2. Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es endémica en América Latina, afectando a áreas rurales de gran pobreza. En la actualidad, se calcula que aproximadamente 100 millones de personas están expuestas a la infección por *T. cruzi* (Coura, 2007). A principios de la década de los 90, se estimó una población de 16-18 millones de individuos infectados, aunque esta cifra disminuyó a 11 millones en el año 2001 (Guzmán-Brancho, 2001) y más recientemente a 8 millones de pacientes infectados (OMS, 2005), de los cuales entre un 20-30% desarrollarán sintomatología. Actualmente, la incidencia en áreas en las que la enfermedad es endémica es de 200.000 nuevos casos al año aproximadamente, representando la tercera infección parasitaria más frecuente a nivel mundial, después de la malaria y la esquistosomiasis (OMS, 2005).

I.3. Patogenia de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas pasa por dos estadios sucesivos: una fase aguda y otra crónica (Prata, 2001).

I.3.1. Aguda

Tras la penetración del parásito a través de una herida de la piel o a través de la mucosa, aparece una zona indurada y eritematosa, denominada «chagoma», acompañada de linfadenopatía local. El signo de Romaña, que es la manifestación clásica de la enfermedad de Chagas aguda, se manifiesta por un edema indoloro bpalpebral y unilateral. Esto ocurre

cuando la vía de entrada del parásito es la membrana conjuntival. Los primeros signos en caso de enfermedad aguda sintomática se acompañan de malestar general, fiebre, anorexia y edema facial y de extremidades inferiores (Prata, 2001). También puede cursar con erupción morbiliforme, linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. La miocarditis grave, aunque es poco frecuente, causa la mayor parte de las muertes en fase aguda. Los signos neurológicos son raros, pero se han comunicado casos de meningoencefalitis. En esta fase, la morbilidad y los síntomas clínicos se encuentran directamente asociados con los niveles circulantes de parasitemia (Prata, 2001).

I.3.2. Crónica

Las manifestaciones agudas de la infección por *T. cruzi* desaparecen de forma espontánea en casi todos los enfermos, dando paso a la fase indeterminada o asintomática crónica de la enfermedad. Entre un 30 y un 40% de las personas infectadas evolucionan a formas sintomáticas durante la fase crónica. Las manifestaciones clínicas pueden ser de diferente gravedad, afectando a diferentes órganos, principalmente corazón y aparato digestivo.

I.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas

En la infección por *T. cruzi*, el diagnóstico de la enfermedad se apoya en datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio (Ferreira *et al.*, 1996). La información clínica es útil en pacientes con sintomatología mientras que en pacientes en fase crónica indeterminada, la epidemiología y los resultados de las pruebas de laboratorio son las herramientas fundamentales en el diagnóstico.

La técnica de laboratorio empleada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas depende de la fase clínica en la que se encuentre el paciente (Luquetti *et al.*, 2000; Apt *et al.*, 2008). En fase aguda, se aplican exámenes parasitológicos directos, pues la parasitemia es elevada en esta fase de la enfermedad. Cuando se trata de diagnosticar un individuo con enfermedad de Chagas crónica, en el que la parasitemia circulante es baja, intermitente o nula, el diagnóstico de la infección se basa, fundamentalmente, en la determinación de anticuerpos específicos frente a antígenos de *T. cruzi*.

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica indeterminada es importante para iniciar el tratamiento del paciente y evitar la transmisión de la enfermedad a través de hemo-derivados y trasplante de órganos (Schmunis 1991, 2007).

I. 5. Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Dos fármacos, cuya introducción en la práctica clínica tuvo lugar hace más de 40 años, son de elección en el tratamiento de la enfermedad de Chagas: benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche (1972); N-bencil-2-nitroimidazol acetamida) y nifurtimox (Lampit®, Bayer (1967); 5-nitrofurano 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideneamina) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) (Bern *et al.*, 2007).

I.6. Prevención de la enfermedad de Chagas

En los últimos 30 años se han realizado grandes avances en la prevención de la enfermedad de Chagas. Dado que, actualmente, no existe vacuna contra la enfermedad, la prevención se ha centrado principalmente en la lucha contra el vector y en frenar transmisión por vías no vectoriales. Así, se ha observado un importante descenso en el número de casos en áreas endémicas tras la instauración de programas de cribado de la enfermedad de Chagas en centros de hemo-donación y tras la aplicación de insecticidas con efecto residual en casas infestadas.

II. OBJETIVOS

El objetivo principal de este TFM fue la evaluación de la PCR y de la serología convencional, como técnicas de monitorización de la respuesta terapéutica al benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica atendidos en la Unidad Regional de Medicina Tropical de Murcia. Este objetivo global se concreta en los siguientes objetivos parciales:

- 1) Evaluar la utilidad de la PCR en la monitorización prospectiva de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes chagásicos crónicos.
- 2) Analizar las técnicas convencionales que utilizan extracto antigénico completo para el seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Manipulación del ADN

III.1.1. Aislamiento del ADN en sangre total periférica

Se tomaron 10 ml de sangre de todos los pacientes a estudio. Este volumen de sangre fue inmediatamente mezclado con el mismo volumen de una solución de hidrocloreuro de guanidina 6 M (preservante y desnaturizante de enzimas) y EDTA 0,2 M

(anticoagulante) a pH 8 (Britto *et al.*, 1993). La muestra se sumergió en un baño de agua hirviendo durante 15 minutos para favorecer la ruptura de la red de minicírculos (Britto *et al.*, 1993), y se conservó a 4°C hasta la extracción de ADN del parásito.

Para la extracción de ADN del parásito se utilizó el *kit Maxwell 16 Blood DNA Purification* (Promega Biotech Iberica) basado en la extracción de ácidos nucleicos mediante la utilización de partículas magnéticas. Se partió de un volumen de 400 µL de la muestra, previamente procesada como se ha descrito anteriormente. La elución se realizó en un volumen final de 200 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción de ADN se realizó por duplicado en cada muestra.

El ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV/visible de mono haz (eppendorf *BioPhotometer plus*) en ng/µL, comprobándose siempre la calidad del ADN extraído a través de valores de absorbancia 260/280 superiores a la unidad.

III.5.2. Amplificación de ADN por PCR

Para la detección del ADN del kinetoplasto de *T. cruzi* se utilizaron los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') y 122 (5'-GTTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3'), que amplifican la región de 330 pares de bases (pb) del ADN del minicírculo del kinetoplasto. La PCR se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito por Murcia *et al* (2010).

La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 75 µL que contenía una concentración 10 mM de mezcla de dNTP (Applied Biosystems), 200 ng de cada oligonucleótido 121 y 122 (Sigma-Aldrich), 2,5 unidades del enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), 15 µL del 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) (Promega) y 10 µL de ADN extraído de cada muestra a estudio (aproximadamente, 200 ng).

El programa de amplificación en el termociclador (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems) incluía un paso inicial de desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 minuto), alineamiento (64°C durante 1 minuto) y polimerización (72°C durante 1 minuto). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos.

Como control interno de amplificación, para garantizar la correcta extracción de ADN con el *kit* comercial, se utilizó un protocolo de PCR similar cuya diana fue ADN ribosómico. Para ello, se utilizó la pareja de cebadores REV (5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3') y HUF (5'-GGACCGCCTGGATACCGC-3').

Además, se incluyeron controles negativos del proceso de extracción de ADN y de amplificación en ambas reacciones de PCR. En cada reacción de PCR con los oligonucleótidos 121 y 122, se incluyeron dos controles positivos, uno de extracción a partir de muestra previa positiva (control positivo 1) y otro de PCR a partir de ADN purificado del parásito (control positivo 2).

III.1.3. Técnicas electroforéticas

Para la detección de los fragmentos de ADN amplificados, el ADN se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa). Se utilizó tampón TBE y la concentración de agarosa fue del 2%.

Para la visualización del producto amplificado se utilizó el reactivo SYBR® Safe DNA Gel Stain (life technologies) diluido 10.000x en la mezcla de agarosa. El tamaño de los fragmentos se calculó usando como referencia el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV (U:GENIUS, Syngene).

Los procesos de extracción de ADN, amplificación mediante PCR y electroforesis en gel se realizaron en áreas de trabajo independientes con el fin de evitar la contaminación.

III.2. Técnicas serológicas

El diagnóstico de enfermedad de Chagas se estableció en base a los criterios de la OMS. Para ello, se utilizaron dos técnicas serológicas que emplean diferentes antígenos-IFI (Inmunofluor Chagas, Biocientífica, Argentina) y ELISA (Bioelisa Chagas, Biokit, España)- siguiendo las instrucciones del fabricante. Aquellos pacientes con resultado positivo para ambas técnicas se consideraron infectados por *T. cruzi*.

Estas técnicas serológicas convencionales utilizan como antígeno bien el parásito completo, como es el caso de la inmunofluorescencia indirecta (IFI), que emplea epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivo y fijados en portaobjetos, sobre los que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo. O bien, extractos solubles de *T. cruzi*, como en los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

Para la realización de las técnicas serológicas comerciales, se extrajo un volumen de 5-10 ml de sangre por paciente en tubo sin anticoagulante. La sangre se centrifugó durante 15 minutos a 2500 r.p.m. para extraer el suero y se guardó a 4°C hasta la realización de las pruebas serológicas en un tiempo siempre inferior a una semana.

III.2.1. IFI

Se utilizó el ensayo comercial de Inmunofluor CHAGAS Kit (Biocientífica S.A.) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incluyeron en el ensayo los controles positivos y negativos suministrados en el *kit*. Para la validación de cada ensayo se comprobó que los resultados de los controles fuesen correctos. Títulos de IFI $\geq 1/80$ se consideraron positivos.

III.2.2. ELISA

Se utilizó el *kit* comercial *T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se describe brevemente el procedimiento. Se aplicaron los procedimientos de control de calidad para la aceptación de resultados. Índices de ELISA ≥ 1 se consideraron positivos.

III.3. Tratamiento con benznidazol

El tratamiento se realizó con benznidazol mediante la administración oral de 5-7 mg/kg peso corporal/día en pacientes pediátricos y 300 mg/día distribuidos en 3 tomas en adultos, durante 60 días (The medical letter on drugs and therapeutics, 2004).

La dosis diaria se incrementó de manera gradual durante un periodo de tres semanas (En adultos, 100mg/día durante la primera semana, 200 mg/día durante la segunda semana y 300 mg/día en adelante) para evitar la aparición de efectos adversos al tratamiento relacionados con dosis acumulativas superiores a 18 gramos, como la polineuritis y la depresión de la médula ósea (Cancado, 2002).

Se informó claramente de los posibles efectos secundarios del tratamiento, así como se aconsejó una dieta baja en grasas y nula en alcohol para evitar las alteraciones digestivas que con frecuencia el benznidazol suele ocasionar en pacientes tratados.

III.4. Población a estudio

III.4.1. Clasificación forma clínica de la enfermedad

Todos los pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas incluidos en el estudio fueron entrevistados en base a una encuesta estructurada con el fin de conocer sus datos demográficos (edad, sexo), epidemiológicos (país y región de origen y años de residencia en España) y clínicos.

Para determinar el estadio clínico de la enfermedad se consideraron los siguientes síntomas: disnea de esfuerzo o reposo, disnea paroxística nocturna, ortopnea, edema de

miembros inferiores, disfagia, reflujo gastroesofágico y estreñimiento. Para definir los grupos clínicos, a cada paciente se le realizó placa de tórax, electrocardiograma y ecocardiograma para el estudio de la función cardíaca y tránsito esófagogastroduodenal y enema opaco para determinar la afectación digestiva. Los pacientes con sintomatología cardíaca se estratificaron en base a la clasificación propuesta por Kuschnir *et al* (1985).

En base a las pruebas clínicas, los pacientes se dividieron en cuatro grupos principales: Chagas crónico asintomático (IND) cuando el paciente carecía de afectación cardíaca y digestiva, Chagas crónico cardíaco (CCC) cuando el paciente presentaba únicamente alteraciones cardíacas, Chagas crónico cardíaco-digestivo (CCCDIG) cuando el paciente presentaba ambas manifestaciones y, finalmente, Chagas crónico digestivo (DIG) cuando el paciente presentaba únicamente sintomatología digestiva.

III.4.2. Cohorte del estudio

Esta cohorte incluyó 166 pacientes con enfermedad de Chagas crónica, diagnosticada según los criterios de la OMS con resultado positivo en dos técnicas serológicas que emplean diferentes antígenos -IFI y ELISA-. Estos pacientes fueron monitorizados a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol mediante técnica de PCR (materiales y métodos, apartado III.5) y serología convencional -IFI y ELISA- (materiales y métodos, apartado III.2.1 y III.2.2), con el fin de evaluar la eficacia del tratamiento.

La mayoría de los pacientes eran bolivianos (161; 97%) frente a un porcentaje minoritario procedentes de otros países de América Latina como Argentina (1; 0,6%), Brasil (1; 0,6%), Ecuador (1; 0,6%), El Salvador (1; 0,6%) y Paraguay (1; 0,6%) (tabla III.1). Los bolivianos eran principalmente de los distritos de Santa Cruz (79; 47,5%), Cochabamba (67; 40%), Sucre (10; 6%) y Chuquisaca (5; 3%). La media (\pm DE) de edad fue 33 ± 11 años. Ningún paciente regresó a su país de origen durante el periodo de seguimiento.

Tabla III.1. Distribución de la procedencia geográfica de los 166 pacientes.

<i>País</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>
Bolivia	161	97%
Argentina	1	0,6%
Brasil	1	0,6%
Ecuador	1	0,6%
El Salvador	1	0,6%
Paraguay	1	0,6%

De acuerdo con su edad, los pacientes se incluyeron en los siguientes grupos: 11 (6,6%) en la categoría de jóvenes (4-19 años), 109 (65,7%) en el grupo de adultos (20-39 años) y, finalmente 46 pacientes (27,7%), se clasificaron como mayores (≥ 40 años) (tabla III.2).

Tabla III.2. Distribución en función del grupo de edad de los 166 pacientes.

<i>Grupo de edad</i>	<i>N (%)</i>
4-19 años	11 (6,6)
20-39 años	109 (65,7)
≥ 40 años	46 (27,7)
<i>Total</i>	<i>166 (100)</i>

N, número de pacientes.

Según los años de residencia en España, los pacientes se clasificaron en dos grupos: 73 pacientes (44%) se incluyeron en el grupo de estancia corta en nuestro país (< 3 años) y 93 pacientes (56%) en el grupo de estancia prolongada (≥ 3 años) (tabla III.3).

Tabla III.3. Distribución en función de los años de residencia en España de los 166 pacientes.

<i>Años residencia en España</i>	<i>N (%)</i>
< 3 años	73 (44)
≥ 3 años	93 (56)
<i>Total</i>	<i>166 (100)</i>

Del total de 166 pacientes estudiados, 99 (58,9%) eran asintomáticos (IND) y 67 (41,1%) sintomáticos. De estos, 37 (22%) presentaron sintomatología cardíaca (CCC), 18 (10,7%) mostraron alteraciones digestivas (DIG) y 12 (7,1%) presentaban ambas manifestaciones, cardíaca y digestiva (tabla III.4).

Tabla III.4. Clasificación clínica de los 166 pacientes.

<i>Clasificación clínica</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>
Asintomáticos	99	58,9%
Cardíacos	37	22%
Digestivos	12	7,1%
Cardíacos-digestivos	18	10,7%

En esta cohorte de 166 pacientes tratados con benznidazol durante 60 días (100 mg, 3 veces/día), 75 (45%) presentaron reacciones adversas al tratamiento, algunas de las cuales requirieron tratamiento sintomático. Los efectos adversos al benznidazol más frecuentes

fueron: hipersensibilidad cutánea (59/166; 35%), intolerancia digestiva (5/166; 3%) y alteraciones neurológicas (5/166; 3%). Un total de 15 pacientes no completó el tratamiento correctamente, en 14 casos se debió a suspensión por efectos adversos al benznidazol y en un caso a un incumplimiento terapéutico de la dosis diaria (tabla III.5).

Tabla III.5. Efectos adversos del tratamiento con benznidazol en la cohorte estudiada.

<i>Efecto adverso</i>	<i>Nº de pacientes</i>	<i>Porcentaje</i>
Hipersensibilidad cutánea	59	35,1%
Intolerancia digestiva	5	3%
Alteraciones neurológicas	5	3%

Para el seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol, a los pacientes se les tomó muestra de sangre periférica para PCR en el momento del diagnóstico (T0) y a los 90 (T1), 150 (T2), 240 (T3), 420 (T4) días y segundo (T5), tercer (T6) y cuarto (T7) año post-tratamiento. Un diagrama ilustrativo del número de pacientes incluidos en cada fase del seguimiento de esta cohorte se muestra en la tabla III.6.

Tabla III.6. Número de pacientes incluidos en cada fase del seguimiento de la respuesta al tratamiento con benznidazol.

<i>Tiempo</i>	<i>T0</i>	<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>
<i>Nº de pacientes</i>	166	141	124	101	117	71	37	4

T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

III.5. Análisis estadístico

Todos los parámetros estadísticos se calcularon con el software SPSS 15.0.

Realizamos un estudio descriptivo en el que las variables numéricas se describieron mediante la media \pm desviación típica y las variables cualitativas con frecuencias y porcentajes tanto en la población global como por grupo de estudio.

Para comparar variables cualitativas, como la edad, años de residencia en España y sintomatología, se utilizaron los tests de McNemar-Bowker, Chi-cuadrado y t de Student.

Para estudiar el descenso en los índices de ELISA y títulos de IFI después del tratamiento con benznidazol se utilizó el test de Friedman y la prueba t de Student respectivamente.

Todos los análisis se consideraron significativos a un nivel $p \leq 0,05$.

III.6. Consideraciones éticas

Los algoritmos de diagnóstico, esquemas de tratamiento y protocolos de seguimiento fueron aprobados por el Comité ético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia, España). Los pacientes fueron informados en detalle acerca del estudio y bajo consentimiento informado aceptaron formar parte del mismo.

IV. RESULTADOS

IV.1. Seguimiento de la parasitemia mediante PCR después del tratamiento con benznidazol

Con el objetivo de estudiar la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes en fase crónica, se analizó la presencia de *T. cruzi* en sangre periférica mediante PCR en 166 pacientes con enfermedad de Chagas que fueron tratados con benznidazol durante 60 días (Materiales y métodos, apartado III.4.2). Para ello, se tomaron muestras de sangre, antes del tratamiento y a diferentes tiempos durante el seguimiento post-tratamiento (ver tabla III.6., materiales y métodos).

Resultados de PCR antes del tratamiento con benznidazol

El estudio parasitológico mediante PCR en sangre periférica de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica antes del tratamiento con benznidazol, reveló que, del total de 166 pacientes, 112 presentaron resultado de PCR positivo antes del tratamiento y 54 obtuvieron un resultado negativo. Por tanto, la sensibilidad de la PCR frente a las dos técnicas diagnóstico-serológicas utilizadas fue del 67,4%. Así, la PCR resultó una herramienta parasitológica sensible en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Dado que no se incluyó un grupo de pacientes control con serología negativa para *T. cruzi*, no fue posible determinar la especificidad de la técnica de PCR.

Para el análisis de los resultados de PCR en la cohorte de 166 pacientes antes del tratamiento con benznidazol, se consideraron variables demográficas (edad), epidemiológicas (tiempo de residencia en España) y clínicas (pacientes sintomáticos o asintomáticos) (Material y métodos, apartado III.4.2). Teniendo en cuenta los rangos de edad de los pacientes, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resultado de PCR ($p=0,001$). Así, la sensibilidad de la PCR frente a las dos técnicas diagnóstico-serológicas utilizadas fue del 100% en el grupo de pacientes con edades comprendidas entre 4 y 19 años, mientras que el porcentaje de pacientes con resultado positivo de PCR se redujo a 72,4% en los pacientes clasificados dentro del grupo de edad de 20 a 39 años, y a 47,8% en aquellos pacientes incluidos en el grupo de ≥ 40 años. Además, el número de pacientes con un resultado positivo de PCR fue significativamente

superior en los individuos cuyo tiempo de residencia en España fue inferior a 3 años (79,5%) frente aquellos cuyo periodo de estancia en nuestro país fue ≥ 3 años (58%) ($p=0,004$). Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los resultados de PCR entre los pacientes asintomáticos (68,7%) y los que presentaron sintomatología en la fase crónica de la enfermedad (65,6%) ($p=0,379$). Estos resultados se muestran en la tabla IV.1.

Tabla IV.1. Resultados de PCR antes del tratamiento con benznidazol en la cohorte estudiada según la edad, el tiempo de residencia en España y la forma clínica de la enfermedad.

Variable	PCR positiva	PCR negativa	p
	N/Total (%)	N/Total (%)	
<i>Grupos de edad</i>			
4-19 años	11/11 (100)	0/11 (0)	0,001
20-39 años	79/109 (72,4)	30/109 (28,6)	
≥ 40 años	22/46 (47,8)	24/46 (52,2)	
<i>Tiempo de residencia en España</i>			
<3 años	58/73 (79,5)	15/73 (20,5)	0,004
≥ 3 años	54/93 (58)	39/93 (42)	
<i>Forma clínica de la enfermedad</i>			
CC asintomático	68/99 (68,7)	31/99 (31,3)	0,379
CC sintomático	44/67 (65,6)	23/67 (34,4)	

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes. CC, enfermedad de Chagas crónica.

Resultados de PCR después del tratamiento con benznidazol

Los resultados de monitorización de la parasitemia mediante PCR a diferentes tiempos post-tratamiento con benznidazol en la cohorte de pacientes estudiada se detallan a continuación.

En el control 90 días post-tratamiento, se realizaron 99 PCRs en aquellos pacientes cuya PCR antes del tratamiento presentó un resultado positivo. Todas las PCRs tuvieron un resultado negativo (100%). De aquellos pacientes con un resultado negativo de PCR antes del tratamiento, 42 pacientes fueron estudiados a los 90 días post-tratamiento y todos presentaron un resultado de PCR negativo.

Un total de 8 pacientes tuvieron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento y completaron el periodo de seguimiento hasta el tercer año post-tratamiento con benznidazol presentando todos sus controles post-tratamiento mediante PCR negativos. Un total de 12 pacientes tuvieron un resultado negativo de PCR antes del tratamiento y permanecieron con parasitemia indetectable mediante PCR hasta el control tercer año post-tratamiento.

A pesar de que el benznidazol produjo un rápido aclaramiento de la parasitemia en el 100% de los pacientes a los 90 días post-tratamiento con benznidazol, un total de 23 pacientes (23/166; 13,8%), presentó picos de parasitemia detectable mediante PCR durante el periodo de seguimiento. De estos, tres pacientes tuvieron un resultado de PCR positivo en más de un control (tabla IV.2).

Así, a los 150 días post-tratamiento, 3 pacientes (3/124; 2,4%) presentaron un resultado de PCR positivo. En dos casos, la PCR antes del tratamiento fue positiva. De estos dos pacientes, uno observó correctamente el tratamiento con benznidazol mientras que el otro paciente no lo completó. El tercer paciente con control de PCR positivo a los 150 días post-tratamiento presentó un resultado de PCR negativo antes del tratamiento con benznidazol. Este paciente no completó la pauta de 60 días de tratamiento con benznidazol (tabla IV.2).

El control 240 días post-tratamiento fue el que presentó mayor número de resultados de PCR positivos con respecto al resto de controles. En total, 10 pacientes (10/101; 9,9%) tuvieron un resultado positivo de PCR. De estos, 9 pacientes presentaron un resultado positivo de PCR antes del tratamiento y 3 de ellos incumplieron la pauta posológica del benznidazol. El décimo paciente con control de PCR positivo a los 240 días post-tratamiento presentó un resultado de PCR negativo antes del tratamiento con benznidazol. Este paciente observó correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.2).

A los 420 días post-tratamiento, 8 pacientes (8/117; 6,8%) tuvieron un resultado positivo de PCR, todos ellos habían presentado un resultado positivo de PCR antes del tratamiento con benznidazol y tan sólo uno de ellos no observó correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.2).

En el control 2º año post-tratamiento, un total de 4 pacientes (4/71; 5,6%) presentaron un resultado positivo de PCR, de los cuales un paciente tuvo un resultado de PCR antes del tratamiento negativo y el resto positivo. Estos 4 pacientes observaron correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.2).

En el control tercer año post-tratamiento, 3 pacientes (3/37; 8,1%) presentaron un resultado positivo de PCR, de los cuales 1 presentaba resultado de PCR antes del tratamiento negativo y los otros dos, positivo. Estos 3 pacientes observaron correctamente el tratamiento con benznidazol (tabla IV.2).

Finalmente, de tan sólo 4 pacientes se pudo completar el seguimiento hasta el control cuarto año post-tratamiento. En los 4 casos, el resultado de PCR para este control fue negativo. Estos 4 pacientes presentaron un resultado positivo de PCR antes del tratamiento con benznidazol. Uno de ellos presentó positivo el control 240 días post-tratamiento mientras que otro presentó positivo el control segundo año post-tratamiento (tabla IV.2).

Los resultados anteriores aparecen además esquematizados en la figura IV.1 en la que no se han representado los pacientes con control cuarto año post-tratamiento por tratarse de un número muy escaso.



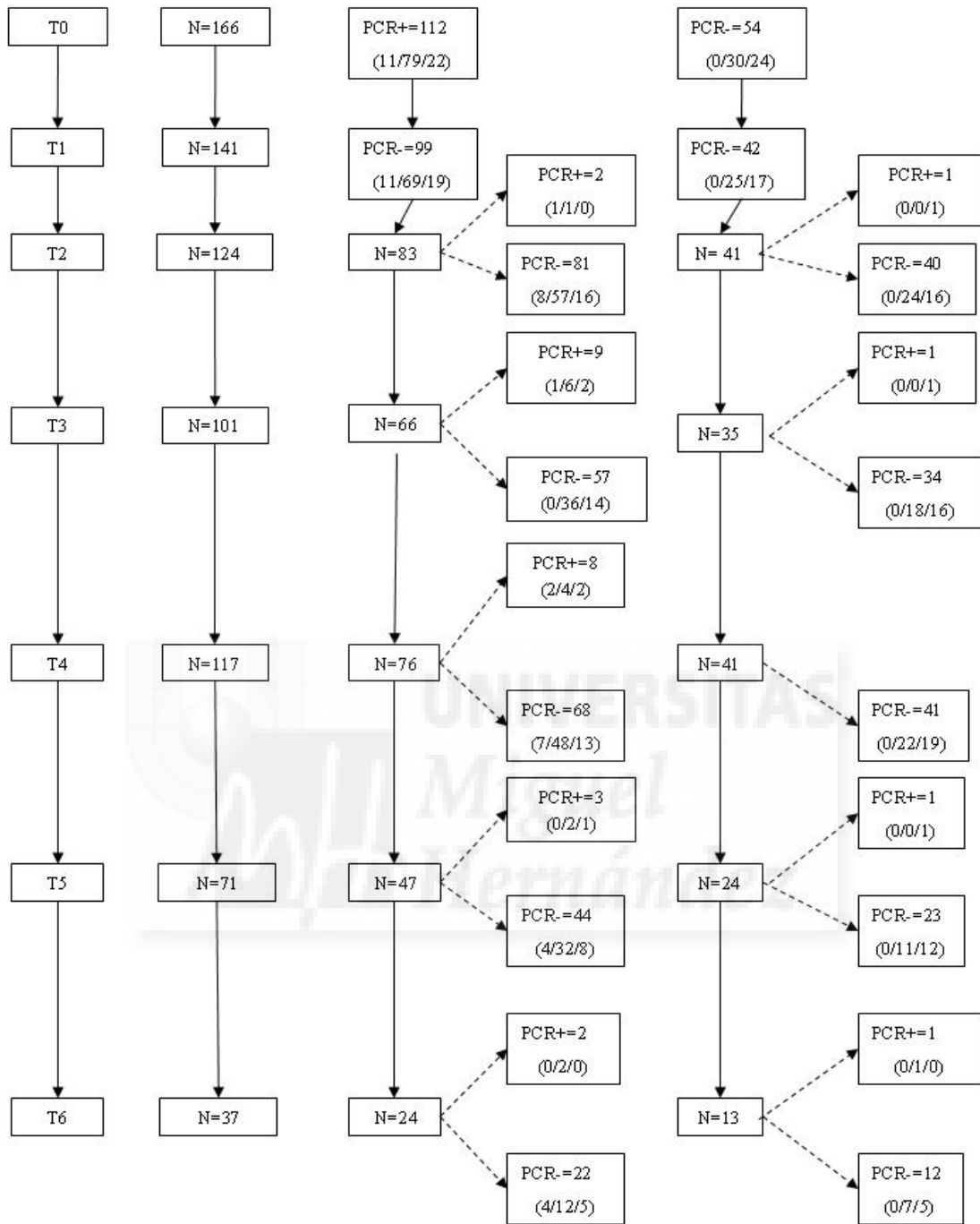


Figura IV.1. Número de pacientes con resultado de PCR antes y después del tratamiento. Para cada control de monitorización, se ha indicado entre paréntesis el número de pacientes incluidos en cada grupo de edad (4-19/20-39/≥40 años). PCR+, resultado de PCR positivo. PCR-, resultado de PCR negativo. N, número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post- tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. En la figura no se han representado los pacientes con control 4º año post-tratamiento debido a su bajo número.

No se observó una correlación estadísticamente significativa al comparar los grupos de edad de los pacientes con un resultado de PCR positivo en los diferentes controles post-tratamiento ($p > 0,05$). Aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa, conviene destacar que la mayoría de los pacientes con picos de parasitemia durante el seguimiento del tratamiento con benznidazol pertenecieron a los grupos de edad de entre 20 y 39 años y ≥ 40 años. En la tabla IV.3 se muestran las características clínicas y epidemiológicas, así como las de cumplimiento de la pauta posológica del benznidazol, de los 23 pacientes con picos de parasitemia detectados mediante PCR después del tratamiento.

Tabla IV.2. Datos de edad, años de residencia en España, clínica y observación del tratamiento con benznidazol de los 23 pacientes con picos de parasitemia detectados mediante PCR después del tratamiento.

Paciente	Edad	ARE ¹	Clínica	OCT ²	Resultado de PCR							
					T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1	36	5	IND	Sí	+	-	-	+	+	-	*	*
2	44	3	IND	No	-	-	+	-	-	-	*	*
3	31	<1	IND	Sí	+	-	*	+	-	-	*	-
4	38	1	IND	Sí	+	-	-	*	-	-	+	*
5	33	1	CCCDIG	Sí	+	*	-	*	-	+	-	-
6	24	1	IND	Sí	-	-	*	-	-	-	+	*
7	40	2	CCCDIG	Sí	-	-	-	+	-	-	*	*
8	27	1	IND	Sí	+	-	-	+	-	*	-	*
9	74	2	CCC	Sí	+	-	-	+	+	+	*	*
10	43	1	IND	Sí	+	-	-	+	-	-	-	*
11	17	2	IND	Sí	+	-	-	*	+	*	-	*
12	22	1	IND	No	+	-	-	+	-	-	-	*
13	31	2	CCC	Sí	+	-	-	+	-	*	*	*
14	43	7	CCCDIG	Sí	+	-	-	-	+	-	-	*
15	32	3	IND	No	+	-	*	+	*	*	*	*
16	29	3	IND	Sí	+	-	-	-	+	-	*	*
17	37	3	IND	Sí	+	-	-	*	+	-	*	*
18	29	1	DIG	Sí	+	-	+	-	-	*	*	*
19	48	2	CCC	Sí	-	-	-	-	-	+	*	*
20	12	3	DIG	No	+	-	+	+	+	-	-	*
21	29	3	IND	Sí	+	-	-	*	-	+	-	*
22	30	2	DIG	Sí	+	*	-	*	+	*	*	*
23	32	2	IND	Sí	+	-	-	-	-	-	+	*

¹Años de residencia en España. ²Observación correcta del tratamiento. IND, Chagas crónico asintomático/indeterminado. CCC, Chagas crónico cardiaco. DIG, Chagas crónico digestivo. CCCDIG, Chagas crónico mixto cardiaco y digestivo. *, muestra no disponible. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

En resumen, en el primer control después del tratamiento (90 días) el 100% de los pacientes tuvo un resultado de PCR negativo. Sin embargo, durante el transcurso del seguimiento, 23 pacientes presentaron al menos un control en el que la parasitemia volvió a ser detectable mediante PCR en una proporción que osciló entre el 2,4% y el 9,9% en función del control (tabla IV.3). De estos 23 pacientes, 4 no observaron correctamente el tratamiento (tabla IV.2).

Tabla IV.3. Resultados de monitorización de la respuesta terapéutica al benznidazol mediante PCR en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

	<i>Antes del tratamiento</i>	<i>Controles de seguimiento post-tratamiento</i>						
		<i>T1</i>	<i>T2</i>	<i>T3</i>	<i>T4</i>	<i>T5</i>	<i>T6</i>	<i>T7</i>
<i>Nº pacientes</i>	166	141	124	101	117	71	37	4
<i>PCR +</i>	112	0	3	10	8	4	3	0
<i>PCR -</i>	54	141	121	91	109	67	34	4
<i>%PCR +</i>	67,4	0	2,4	9,9	6,8	5,6	8,1	0

PCR+, PCR con resultado positivo. PCR-, PCR con resultado negativo. %PCR +, porcentaje de pacientes con resultado positivo de PCR. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

En aquellos pacientes que presentaron un resultado de PCR positivo antes del tratamiento, la PCR permitió determinar la acción del benznidazol. Ya que, tras el tratamiento, se observó una disminución de la carga parasitaria en los pacientes hasta niveles indetectables mediante esta técnica, resultando una herramienta útil para determinar a corto plazo la eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Esta eficacia parasiticida del benznidazol fue muy elevada en nuestra cohorte de pacientes, ya que en el 100% de los mismos se produjo un aclaramiento de la parasitemia que determinó un resultado negativo de PCR a los 90 días post-tratamiento. Aunque un resultado de PCR negativo no indica ausencia de la enfermedad, la PCR es una herramienta útil para detectar el fracaso terapéutico a corto plazo en pacientes que presentan resultados positivos después del tratamiento. Teniendo en cuenta las variaciones de la parasitemia durante el largo curso de la enfermedad de Chagas crónica, con picos intermitentes, es necesaria la búsqueda de nuevas técnicas y marcadores que permitan

conocer la eficacia del tratamiento con benznidazol en pacientes en la fase crónica de la enfermedad a corto plazo.

IV.2. Seguimiento de los niveles de anticuerpos después del tratamiento con benznidazol mediante serología convencional

Con el objetivo de estudiar la variación en el nivel de anticuerpos en suero tras el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante serología convencional, los 166 pacientes que constituyen la misma cohorte de pacientes que el apartado anterior (materiales y métodos, apartado III.4.2) fueron evaluados a diferentes tiempos post-tratamiento mediante dos técnicas serológicas: IFI (Inmunofluor CHAGAS Kit (Biocientífica S.A.)) y ELISA (*T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostic, USA)) (materiales y métodos, apartado III.2). El número de pacientes incluido en cada control se muestra en la tabla IV.4.

Tabla IV.4. Número de pacientes con enfermedad de Chagas crónica a los que se les determinó el índice/ título de anticuerpos frente a *T. cruzi* mediante técnicas serológicas convencionales a diferentes tiempos post-tratamiento.

Tiempo	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Nº pacientes	166	121	102	90	86	21	17	3

T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

Resultados de serología antes del tratamiento con benznidazol

El diagnóstico de enfermedad de Chagas se estableció en base a los criterios de la OMS, según los cuales, un paciente se considera infectado por *T. cruzi* cuando presenta resultado positivo en dos técnicas serológicas que empleen diferentes antígenos (IFI (parásito completo) y ELISA (extractos solubles y/o purificados que contienen una mezcla compleja de antígenos)).

Del total de 166 pacientes incluidos en este ensayo, todos presentaron resultado positivo mediante las dos técnicas serológicas empleadas -IFI y ELISA- antes del tratamiento con benznidazol. Índices de ELISA ≥ 1 se consideraron positivos y títulos de IFI $\geq 1/80$ se consideraron positivos. Para la determinación del título de IFI con fines diagnósticos se realizaron 2 diluciones seriadas de los sueros de los pacientes: 1/80 y 1/160. Los pacientes se clasificaron en función de su índice de ELISA en uno de los siguientes grupos: índices ≥ 1 hasta 4, ≥ 4 hasta 8 y ≥ 8 hasta 12.

Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas serológicas en la cohorte de 166 pacientes antes del tratamiento con benznidazol se muestran en la tabla IV.5 (IFI) y en la tabla IV.6 (ELISA).

Tabla IV.5. Resultado de la técnica serológica IFI antes del tratamiento con benznidazol.

Título de IFI	N/Total (%)
1/80	17/166 (10,2)
1/160	149/166 (89,8)

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes.

Tabla IV.6. Resultado de la técnica serológica ELISA antes del tratamiento con benznidazol.

Índices de ELISA	N/Total (%)
1-4	23/166 (13,9)
4-8	88/166 (53)
8-12	55/166 (33,1)

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes.

Un 89,8% de los pacientes presentó un título ≥ 160 mediante IFI. Un 53% de los pacientes presentó un índice de ELISA ≥ 4 hasta 8.

Al estudiar los resultados de serología convencional en la cohorte de 166 pacientes antes del tratamiento con benznidazol, se consideraron variables demográficas (edad), epidemiológicas (tiempo de residencia en España) y clínicas (pacientes sintomáticos o asintomáticos) (materiales y métodos, apartado III.4.1). Así, un total de 11 pacientes presentaron una edad comprendida entre los 4 y los 19 años, 109 pacientes se incluyeron en el grupo de edad comprendido entre 20 y 39 años y 46 pacientes tenían una edad ≥ 40 años. El tiempo de residencia en España fue inferior a 3 años en 73 pacientes y ≥ 3 años en 93 pacientes. En función de la forma clínica de la enfermedad, 99 pacientes se incluyeron en el grupo de asintomáticos y 67 presentaron sintomatología en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el resultado de serología convencional mediante IFI y ELISA antes del tratamiento con benznidazol en función del grupo de edad ni de la forma clínica de la enfermedad. No obstante, la diferencia en los títulos de IFI fue estadísticamente significativa en función de los años de residencia en España. Así, el número de pacientes con un título de IFI superior a 1/160 fue significativamente superior en aquellos pacientes cuyo periodo de estancia en España fue inferior a tres años (97,2%; $p=0,043$), reflejando, probablemente, un periodo de tiempo menor desde el momento de la infección hasta la realización de las pruebas. Por el contrario, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los índices de

ELISA en función de los años de residencia en España. Estos resultados se muestran en la tabla IV.7.

Tabla IV.7. Resultados de serología convencional mediante técnica de IFI y ELISA antes del tratamiento con benznidazol en la cohorte estudiada según la edad, el tiempo de residencia en España y la forma clínica de la enfermedad.

Variable	IFI N/total (%)		p	ELISA N/total (%)			p
	1/80	1/160		1-4	4-8	8-12	
<i>Grupos de edad</i>							
4-19 años	0/11 (0)	11/11 (100)		0/11 (0)	7/11 (63,6)	4/11 (36,4)	
20-39 años	8/109 (7,4)	101/109 (92,6)	>0,05	15/109 (13,7)	58/109 (53,2)	36/109 (66,9)	>0,05
≥40 años	4/46 (8,7)	42/46 (91,3)		8/46 (17,4)	23/46 (50)	15/46 (32,6)	
<i>Tiempo de residencia en España</i>							
<3 años	2/73 (2,8)	71/73 (97,2)		9/73 (12,3)	37/73 (50,6)	27/73 (37,1)	
≥3 años	10/93 (10,7)	83/93 (89,3)	0,043	14/93 (15)	51/93 (54,8)	28/93 (30,2)	>0,05
<i>Forma clínica de la enfermedad</i>							
CC Asintomático	7/99 (7,1)	92/99 (92,9)		10/99 (10,2)	54/99 (54,5)	35/99 (35,3)	
CC Sintomático	5/67 (7,5)	62/67 (92,5)	>0,05	13/67 (19,4)	34/67 (50,7)	20/67 (29,9)	>0,05

Resultados de serología después del tratamiento con benznidazol

Al estudiar la variación en los niveles de anticuerpos en los diferentes controles post-tratamiento en la población estudiada, se observó que el porcentaje de pacientes con un determinado valor de anticuerpos mediante IFI/ELISA se mantuvo sin diferencias significativas durante los controles post-tratamiento.

Los resultados obtenidos mediante ambas técnicas serológicas se muestran en la tabla IV.8 para IFI y tabla IV.9 para ELISA. En las figuras, no se han representado los resultados de los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes incluidos.

Tabla IV.8. Resultado de la técnica serológica IFI [N/Total, (%)] en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol.

IFI	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Negativa	0	0	0	0	1/86 (1,1)	2/21 (9,5)	2/17	0
1/80	17/166 (10,2)	22/120 (18,1)	24/101 (23,5)	18/90 (19,9)	19/86 (22,2)	4/21 (19)	2/17	2/3
1/160	149/166 (89,8)	98/120 (80,9)	79/101 (76,5)	72/90 (80,1)	66/86 (76,7)	15/21 (71,5)	13/17	1/3

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes. Los porcentajes no se han indicado en los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

Tabla IV.9. Resultado de la técnica serológica ELISA [N/Total, (%)] en los diferentes controles post-tratamiento con benznidazol.

ELISA	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Negativa	0	0	0	0	1/86 (1,1)	2/21 (9,5)	2/17	0
1-4	23/166 (13,9)	6/120 (6)	5/101 (5)	12/90 (13,4)	9/86 (10,6)	3/21 (14,4)	0	0
4-8	88/166 (53)	57/120 (47)	59/101 (58,4)	54/90 (60)	59/86 (68,6)	14/21 (66,6)	8/17	1/3
8-12	55/166 (33,1)	57/120 (47)	37/101 (36,6)	24/90 (26,6)	17/86 (19,7)	2/21 (9,5)	7/17	2/3

N, número de pacientes. Total, número total de pacientes. Los porcentajes no se han indicado en los controles tercer y cuarto año post-tratamiento debido al bajo número de pacientes. T0, antes del tratamiento. T1, 90 días post-tratamiento. T2, 150 días post-tratamiento. T3, 240 días post-tratamiento. T4, 420 días post-tratamiento. T5, segundo año post-tratamiento. T6, tercer año post-tratamiento. T7, cuarto año post-tratamiento.

Del total de 166 pacientes estudiados, 3 de ellos (1,8%), presentaron un resultado negativo de IFI y ELISA durante el periodo de seguimiento, pudiendo garantizar su curación en la fase crónica de la enfermedad de Chagas por la ausencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* al presentar dos pruebas serológicas convencionales negativas. El primer caso fue

un hombre de 44 años de edad, boliviano, con enfermedad de Chagas crónica cardíaca que presentó un resultado negativo de IFI y ELISA en el control tercer año post-tratamiento. El segundo caso fue una mujer de 35 años, ecuatoriana, con enfermedad de Chagas crónica mixta cardíaca-digestiva que presentó un resultado negativo de IFI y ELISA en el control 420 días y segundo año post-tratamiento. El tercer caso fue una mujer de 22 años, boliviana, que presentó un resultado negativo para ambas técnicas serológicas en el control 2º año post-tratamiento. En los tres casos destacaron valores de IFI y ELISA bajos antes del tratamiento (1/80-3,8; 1/80-1,2 y 1/80-1,9, respectivamente). Los pacientes presentaron un resultado de PCR negativo antes y después del tratamiento, indicando que en los tres casos existía un bajo nivel de parasitemia. Además, el tiempo de residencia en España, y por tanto fuera de zona endémica, sin exposición al parásito, fue superior a los tres años para los tres pacientes.

Un 98,2% de los pacientes (163/166) de la cohorte estudiada continuó con un resultado positivo para ambas técnicas serológicas durante todo el periodo de estudio, no pudiéndose considerar en éstos la cura de la enfermedad tras el tratamiento con benznidazol. Las diferencias en los índices de ELISA comparando el inicio con los sucesivos controles post-tratamiento no fueron estadísticamente significativas ($p=0,282$). Estas diferencias tampoco resultaron estadísticamente significativas para los títulos de IFI ($p>0,5$). Dado que los niveles de anticuerpos se mantuvieron elevados frente a los antígenos empleados en las técnicas serológicas convencionales durante un tiempo prolongado después del tratamiento, las técnicas de serología convencional no resultaron útiles para la monitorización a corto plazo de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

V. DISCUSIÓN

V.1. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante PCR

La sensibilidad de la PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica frente a las dos técnicas diagnóstico-serológicas convencionales utilizadas en nuestro estudio fue del 67,4%. Este resultado de sensibilidad diagnóstica de la PCR coincide con los publicados por otros autores (Ávila *et al.*, 1993; Britto *et al.*, 1995; Gomes *et al.*, 1999; Solari *et al.*, 2001; Murcia *et al.*, 2010). La sensibilidad de la PCR comparada con los métodos serológicos en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica se ha descrito entre un 59% y un 100%, en función de varios factores. Estos son, principalmente, el área geográfica y la edad de los sujetos estudiados (Ávila *et al.*, 1993; Wincker *et al.*, 1994a; Wincker *et al.*, 1994b; Britto *et al.*, 1995).

En este trabajo se continúa con el estudio publicado por Murcia *et al.* (2010) en el que se evalúa la utilidad de la técnica de PCR frente al ADN del minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* como herramienta para la monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica residentes en área no endémica, en la que la posibilidad de re-infección está descartada.

La evaluación de la cura de la enfermedad de Chagas en pacientes con infecciones crónicas es controvertida y difícil de demostrar, principalmente por la falta de técnicas sensibles y específicas para documentar la cura parasitológica en estos pacientes (Krettli *et al.*, 1984; Gomes *et al.*, 2009; Perez-Molina *et al.*, 2009; Muñoz-Davila *et al.*, 2011). En la década de los 90, ensayos basados en la técnica de PCR se utilizaron para detectar ADN de *T. cruzi* en la sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica con una adecuada sensibilidad, demostrando ser una herramienta prometedora para evaluar el fallo terapéutico tras el tratamiento específico de las infecciones crónicas (Ávila *et al.*, 1991; Britto *et al.*, 1993; Wincker *et al.* 1994a, b; Britto *et al.*, 1995; Junqueira *et al.*, 1996; Gomes *et al.*, 1999; Britto *et al.*, 2001). Este hecho no resultó sorprendente, ya que la PCR había demostrado su utilidad en la detección de resistencias a fármacos en otras infecciones parasitarias que continúan siendo prevalentes en áreas endémicas, como por ejemplo, la leishmaniasis y la malaria (Wilson *et al.*, 2005).

El valor de las técnicas parasitológicas en el seguimiento de la respuesta al tratamiento de pacientes chagásicos, reside en los resultados positivos que permiten obtener. Por tanto, cuanto mayor sea la sensibilidad diagnóstica de la PCR en la enfermedad de Chagas crónica, tanto mejor herramienta será para la monitorización de la eficacia del tratamiento con benznidazol en estos pacientes. Ya que, un resultado negativo de parasitemia detectado mediante PCR en pacientes con parasitemia detectable previa al tratamiento, es indicativo de la eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia. No obstante, un resultado de PCR negativo después del tratamiento no es indicativo de cura de la enfermedad en pacientes que continúen presentando anticuerpos anti- *T. cruzi*. Así, en el caso de la enfermedad de Chagas crónica continúa siendo necesaria la búsqueda de nuevas técnicas y/o marcadores que permitan evaluar más convenientemente la eficacia del tratamiento farmacológico (Gomes *et al.*, 2009; Muñoz-Davila *et al.*, 2011).

En nuestro estudio, la gran mayoría de pacientes procedían de Bolivia, principalmente de los distritos de Cochabamba y Chuquisaca. La única paciente incluida en la cohorte procedente de Brasil presentó un resultado de PCR persistentemente positivo en los diferentes controles post-tratamiento indicando resistencia al tratamiento farmacológico. Así, la PCR fue una herramienta sensible y específica para la detección temprana de la sensibilidad del parásito al benznidazol, permitiendo una modificación rápida de la terapia

antiparasitaria en casos de resistencia o reactivación de la infección chagásica (Murcia *et al.*, 2010).

De acuerdo con nuestros resultados, el 100% de los pacientes tratados que tuvieron un resultado de PCR positivo en sangre periférica antes del tratamiento con benznidazol, presentaron un resultado negativo de PCR a los 90 días post-tratamiento, reflejando la eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia (Murcia *et al.*, 2010). Este porcentaje es superior a otros publicados previamente (Britto *et al.*, 1995; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Britto *et al.*, 2001; Solari *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2009). Sin embargo, cabe destacar, que este estudio fue llevado a cabo en un área libre de transmisión vectorial, donde la ausencia de triatominos permite descartar la posibilidad de re-infección durante el periodo de seguimiento. Únicamente, un porcentaje de los pacientes tratados que osciló entre 2,4% y 9,9%, en función del control post-tratamiento, mostró un resultado positivo de PCR en sangre periférica después de la quimioterapia. Sin embargo, éste es un estudio de seguimiento a corto plazo, y teniendo en cuenta los picos de parasitemia a lo largo del curso prolongado de la infección crónica por *T. cruzi*, algunos pacientes podrían volver a presentar un resultado positivo de PCR a más largo plazo (Murcia *et al.*, 2010). Por esta razón, esta cohorte, bien caracterizada, de pacientes con enfermedad de Chagas crónica continúa en seguimiento en nuestra unidad con el fin de realizar controles de monitorización post-tratamiento mediante PCR a más largo plazo. Estudios posteriores permitirán establecer si existe una asociación entre la situación clínica del paciente y los picos de parasitemia detectados mediante PCR, así como la correlación entre un resultado de PCR persistentemente negativo y la eficacia del tratamiento con benznidazol.

Un porcentaje que osciló entre 2,8% y 7,7% de pacientes con resultado de PCR negativo antes del tratamiento con benznidazol, presentó un resultado de PCR positivo en los diferentes controles post-tratamiento. Estos resultados subrayan la importancia de la PCR como técnica de monitorización, incluso en pacientes en los que, previa administración del tratamiento, la parasitemia fue indetectable mediante PCR.

De los 23 pacientes con un resultado de PCR positivo después del tratamiento, 4 no observaron correctamente el tratamiento con benznidazol, incumpliendo las pautas de posología. En pacientes con infección crónica, el incumplimiento de la duración del tratamiento con benznidazol se caracterizó por una parasitemia indetectable mediante PCR en el primer control post-tratamiento (60 días en agudos y 90 días en crónicos), pero detectable en los sucesivos. De estos resultados se deduce que, la elevada eficacia del benznidazol en el aclaramiento de la parasitemia se manifiesta aún cuando el número de dosis administradas del fármaco sea inferior. Esto determina que en el primer control post-tratamiento (cuando la administración del fármaco es más reciente), la parasitemia evaluada mediante PCR sea indetectable, mientras que la parasitemia vuelve a ser detectable en los controles post-tratamiento más alejados en el tiempo del momento de administración del

benznidazol (150 días post-tratamiento en casos agudos y 150, 240, 420 días y segundo y tercer año post-tratamiento en casos crónicos). De esta manera, la dosis inferior de benznidazol recibida en los casos de incumplimiento terapéutico de este estudio, fue suficiente para aclarar la parasitemia inicialmente pero no para mantenerla indetectable en el tiempo. Lo que pone de manifiesto la importancia de mantener el tratamiento con benznidazol durante 60 días (The medical letter on drugs and therapeutics, 2004).

Como se ha descrito anteriormente, la eficacia del tratamiento con benznidazol es superior cuanto menor es la edad del paciente (Schijman *et al.*, 2003). En nuestro estudio, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas al evaluar la edad de los pacientes con resultado de PCR positivo después del tratamiento durante el periodo de estudio. No obstante, el número de pacientes con un resultado de PCR positivo después del tratamiento fue menor en el grupo de pacientes jóvenes (9-19 años), con respecto al de adultos (19-39 años), y mayores (≥ 40 años), lo que está en concordancia con publicaciones previas.

V.2. Monitorización de la respuesta al tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante serología convencional

La conversión a un resultado de serología de Chagas negativo es el criterio para considerar resuelta la enfermedad de Chagas (Cancado, 1999). En nuestro estudio, tan sólo tres pacientes (de un total de 166; 1,8%) presentaron un resultado de serología negativo frente a *T. cruzi* durante el periodo de seguimiento (al primer, segundo y tercer año respectivamente), pudiendo garantizarse la curación de la enfermedad. Cabe destacar que, en los tres casos, los índices de ELISA y títulos de IFI antes del tratamiento fueron bajos. Además, no se detectó parasitemia mediante PCR ni antes ni después del tratamiento con benznidazol y, los tres pacientes, llevaban varios años de residencia en nuestro país y por tanto fuera de área endémica. Esto podría indicar que la infección estaba cerca de la fase de curación en el momento del diagnóstico.

En general, en los enfermos crónicos, la sero-conversión acontece entre 8 y 10 años después del tratamiento específico y tan sólo en el 15% de los sujetos estudiados (Viotti *et al.*, 1994; Gallerano y Sosa, 2000; Viotti *et al.*, 2006; Fabbro *et al.*, 2007). No obstante, Fernandes *et al* (2009) y Viotti *et al* (2011) publicaron tasas de curación del 5% y el 21% respectivamente, al tercer año post-tratamiento. En nuestro trabajo, tras un periodo de seguimiento de hasta cuatro años, los anticuerpos siguieron detectables en la práctica totalidad de los pacientes (98,2%). En base a nuestros resultados, los métodos serológicos resultan muy útiles en el diagnóstico de la fase crónica de la enfermedad pero no se pueden utilizar para la monitorización de la eficacia del tratamiento anti-parasitario durante esta fase. Se requiere de un periodo de seguimiento muy prolongado para poder observar una

caída significativa en los niveles de anticuerpos que indique un posible beneficio del tratamiento con benznidazol, y un tiempo de estudio superior para demostrar la eliminación de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* en pacientes que se han curado.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

- 1) En pacientes con enfermedad de Chagas crónica, la monitorización de la respuesta al tratamiento mediante PCR permite la detección de fallos terapéuticos y picos de parasitemia a lo largo del curso prolongado de la enfermedad.
- 2) La serología convencional es la técnica de referencia en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica, no obstante, no es útil para la monitorización del tratamiento con benznidazol, ya que los niveles de anticuerpos son detectables durante años después del tratamiento.



- Apt, B.W., Heitmann, G.I., Jercic, L.M.I., Jofré, M.L., Muñoz, C, Noemí, H.I., San Martín, V., Sapunar, P.J., Torres, H.M., y Zulantay, A.I. (2008).** Laboratory diagnosis of Chagas disease. *Revista Chilena infectología*, 25(5), 380-383.
- Avila, H.A., Sigman, D.S., Cohen, L.M., Millikan, R.C., y Simpson, L. (1991).** Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and biochemical parasitology*, 48, 211–221.
- Avila, H.A., Borges, J., Thiemann, O., de Paiva, E., Degrave, W., Morel, C.M., y Simpson, L. (1993).** 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. *Journal of clinical microbiology*, 31(9), 2421-2426.
- Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A. Jr, Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., Maguire, J.H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L.V., Gilman, R.H., Reyes, P.A., Salvatella, R., y Moore, A.C. (2007).** Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *The journal of the American Medical Association*, 298, 2171–2181.
- Brener, Z. (1973).** Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual review of microbiology*, 27, 347-382.
- Britto, C., Cardoso, M.A., Wincker, P., y Morel, C.M. (1993).** A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 88(1), 171-172.
- Britto, C., Cardoso, M.A., Vanni, C.M., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S.S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C.M., y Wincker, P. (1995).** Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 110, 241-247.
- Britto, C., Silveira, C., Cardoso, M.A., Marques, P., Luquetti, A., Macêdo, V., y Fernandes, O. (2001).** Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by

xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 96, 823-826.

Cancado, J.R. (1999). Criteria of Chagas disease cure. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 94, 331-335.

Cancado, J.R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44, 29-37.

Coura, J.R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed. A background article. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 102(1), 113-122.

Fabbro, D.L., Streiger, M., Arias, E., Bizai, M.L., Del Barco, M., y Amicone, N. (2007). Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40, 1-10.

Fernandes, C.D., Tiecher, F.M., Balbinot, M.M., Liarte, D.B., Scholl, D., Steindel, M., y Romanha, A. (2009). Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 27-32.

Ferreira, A.W., y Ávila, S.L.M. (1996). Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 38(4), 264.

Gallerano, R.R., y Sosa, R.R. (2000). Interventional study in the natural evolution of Chagas disease. Evaluation of specific antiparasitic treatment. Retrospective-prospective study of antiparasitic therapy. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas (Córdoba, Argentina)*, 57, 135-162.

Gomes, M.L., Galvão, L.M., Macedo, A.M., Pena, S.D., y Chiari, E. (1999). Chagas disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 60, 205-210.

- Gomes, Y.M., Lorena, V.M., y Luquetti, A.O. (2009).** Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 104(1), 115-121.
- Guzmán-Brancho, C. (2001).** Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in parasitology*, 17, 372-377.
- Junqueira, E.C., y Whicker, P. (1996).** Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene*, 90(2), 129-132.
- Krettli, A.U., y Brener, Z. (1984).** Resistance against *Trypanosoma cruzi* associate to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of immunology*, 128, 2009-2012.
- Kuschnir, E., Sgammini, H., Castro, R., Evequoz, C., Ledesma, R., y Brunetto J. (1985).** Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arquivos brasileiros de cardiologia*, 45, 249-256.
- Lauria-Pires, L., Braga, M.S., Vexenat, A.C., Nitz, N., Simões-Barbosa, A., Tinoco, D.L., y Teixeira, A.R. (2000).** Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63, 111-118.
- Luquetti, A.O., y Rassi, A. (2000).** Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. En Brener, Z., Andrade, Z.A., y Barral-Neto, M. (Eds.). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 344-378.
- Muñoz-Davila, M.J., Murcia, L., y Segovia, M. (2011).** The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. *Expert review of anti-infective therapy*, 9(1), 5-7.
- Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz-Davila, M.J., Iborra, M.A., y Segovia, M. (2010).** Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(8), 1759-1764.

- OMS, Organización Mundial de la Salud. (2005).** Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas.
- Pérez-Molina, J.A., Pérez-Ayala, A., Moreno, S., Fernández-González, M.C., Zamora, J., y López-Velez, R. (2009).** Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64, 1139-1147.
- Prata, A. (2001).** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases*, 1, 92-100.
- Rassi Jr, A., Rassi, A. y Marin-Neto, J.A. (2010).** Chagas disease. *Lancet*, 375, 1388-1402.
- Schijman, A.G., Altcheh, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M.J., y Freilij, H. (2003).** Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 441-449.
- Schmunis, G.A. (1991).** *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion*, 31, 547-557.
- Schmunis, G.A. (2007).** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(1), 75-85.
- Solari, A., Ortíz, S., Soto, A., Arancibia, C., Campillay, R., Contreras, M., Salinas, P., Rojas, A., y Schenone, H. (2001).** Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48, 515-519.
- The medical letter on drugs and therapeutics. (2004).** Drugs for parasitic infections. Abramowicz, M. (Ed). New Rochelle (NY), The medical letter, 1-12.
- Viotti, R., Vigliano, C., Armenti, H., y Segura, E. (1994).** Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American heart journal*, 127, 151-162.

- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M.G., Postan, M., Armenti, A. (2006).** Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas' disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Annals of internal medicine*, 144, 724-734.
- Viotti, R., Vigliano, C., Alvarez, M.G., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A., De Rissio, A.M., Cooley, G., Tarleton, R., y Laucella, S. (2011).** Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 5(9), e1314.
- Wilson, P.E., Alker, A.P., y Meshnick, S.R. (2005).** Real-time PCR methods for monitoring antimalarial drug resistance. *Trends in parasitology*, 21(6), 278-283.
- Wincker, P., Bosseno, M.F., Britto, C., Yaksic, N., Cardoso, M.A., Morel, C.M., y Brenière, S.F. (1994a).** High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS microbiology letter*, 124, 419-23.
- Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., y Morel, C.M. (1994b).** Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 51, 771-777.

