

Evaluación de métodos de diagnóstico para la enfermedad de Chagas en una cohorte de pacientes del partido de La Matanza

Director: Dra. Gabriela Vanesa Levy

Integrantes del equipo de trabajo:

- María José Abriata
- Analía Gabriela Níttolo
- Margarita Bisio
- Juan Miguel Burgos
- Alberto Babil Marani
- Rocío Rivero
- Marcelo Carlos Robi
- Federico González
- Miriam Inglese

I. Introducción

La enfermedad de Chagas, producida por el parásito *Trypanosoma cruzi*, es uno de los principales problemas de salud pública de Latinoamérica. Se estima que existen unos 7 millones de personas infectadas y más de 100 millones en riesgo de contraer la infección [1,2]. En zonas endémicas rurales o de precarias condiciones de vida, la transmisión vectorial es la principal ruta de infección. Sin embargo, los movimientos poblacionales han llevado la infección a los grandes centros urbanos que se encuentran fuera de áreas endémicas, incluso a Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía, constituyendo una problemática novedosa en países receptores migracionales que no contemplan en sus búsquedas serológicas la infección por *T. cruzi*. En estas regiones no endémicas las vías de transmisión congénita, transfusional y trasplantacional se vuelven de gran relevancia para el establecimiento de la infección [1].

La infección por *T. cruzi* evoluciona desde una etapa aguda, de pocas semanas de duración caracterizado por una alta parasitemia y síntomas generalmente inespecíficos, a una etapa crónica asintomática, de baja parasitemia, que puede prolongarse durante años, e incluso toda la vida del paciente. Sin embargo, años después de la infección, el 30-40% de los infectados desarrolla alguna de las patologías características de la enfermedad de Chagas. Entre ellas, un 20-30% de los infectados desarrolla cardiopatía (cardiopatía chagásica crónica, CCC), 8% megavísceras, un 2% afecciones combinadas o afecciones del sistema nervioso central, usualmente asociadas a estados de inmunosupresión [3–5].

En el año 2009, en base a diferencias genéticas, seis grupos diferentes o unidades discretas de tipificación (UDTs) fueron definidos dentro de la especie *T. cruzi* [6]. En los últimos años, varios estudios han mostrado que estos grupos poseen virulencias disímiles y distribuciones geográficas diferenciales y, en relación con la infección humana, varias UDTs han sido halladas en distintas muestras biológicas, aunque la relación de ellos con la evolución de la infección y el desarrollo de patologías específicas sigue siendo un tema de estudio.

En el año 2010, la Organización Mundial de la Salud (OMS) señaló la necesidad de buscar sistemas de diagnóstico que permitan una rápida detección de la infección por *T. cruzi* en los centros de atención del primer nivel, que no cuentan con equipamiento complejo de laboratorio [7]. Desde entonces se han realizado algunos estudios para evaluar el desempeño de las pruebas de diagnóstico rápidas (PDR) en diferentes poblaciones y con diferentes muestras. Algunos estudios proponen a las PDR para ensayos tipo screening en terreno, es decir, no son criterio de diagnóstico en la actualidad, y el resultado obtenido requiere una posterior confirmación por el método de referencia (dos técnicas serológicas positivas). Entre las ventajas, se distingue la no necesidad de operadores calificados, que el resultado se obtiene en pocos minutos, no se requiere refrigeración de los reactivos y se pueden aplicar a distintos tipos de muestras [8].

Antecedentes

La enfermedad de Chagas representa un importante problema de salud pública, amenazando cerca del 25% de la población total en América Latina, constituyendo una de las causas más

frecuentes de insuficiencia cardíaca en el continente [9],[10]. La zoonosis afecta a unos 7 millones de personas y provoca unas 14.000 muertes al año [9]. La infección por *T. cruzi* en América tiene una incidencia anual de 30.000 casos por transmisión vectorial y 9.000 casos de recién nacidos infectados por transmisión vertical. Según datos del Ministerio de Salud de la Nación, en nuestro país existen entre 1 y 3 millones de individuos infectados, pudiendo un 30% de ellos presentar alteraciones cardíacas de distinto grado [11].

Debido a la migración poblacional, se estima que unas 400.000 personas infectadas viven fuera de países endémicos, principalmente en Europa y Estados Unidos [12,13]. En particular, en este último se estima la presencia de unos 300.000 individuos infectados de los cuales unos 40.000 han desarrollado CCC [14].

Si bien el territorio argentino está dentro de la región endémica para la infección, existen diferentes niveles de riesgo de transmisión vectorial entre regiones, según sus características naturales, ecoepidemiológicas y socioeconómicas de su geografía y su población. La Provincia de Buenos Aires (PBA), junto con Chubut, Santa Cruz y Tierra del Fuego, se consideran libres de riesgo de transmisión vectorial, siendo certificadas por la OMS como libres de la transmisión domiciliar por *Triatoma infestans*, el principal vector domiciliario en Argentina[15], por lo tanto, son consideradas regiones no endémicas. Sin embargo, como se mencionó, la migración es una vía importante de generación de casos de Chagas en las ciudades o conglomerados urbanos. En las últimas décadas, la PBA ha recibido poblaciones migrantes provenientes de regiones argentinas y de países vecinos con alta prevalencia de la infección, por lo que la enfermedad de Chagas también se ha urbanizado en esta región [16,17]. En un estudio retrospectivo en el partido bonaerense de Florencio Varela, se observó que la mayor parte de los diagnósticos de la infección son tardíos (la edad media de realización del diagnóstico fue de 35.5 años) y existe desconocimiento poblacional de los daños a largo plazo [18]. En particular, para el partido de La Matanza y de acuerdo con los últimos datos censales disponibles del año 2010, más de un 75% del total de los migrantes provienen de Paraguay o Bolivia [19]. Paraguay ha logrado controlar la transmisión vectorial domiciliar a partir del 2018 [20], mientras que Bolivia presenta la prevalencia regional más alta para la enfermedad de Chagas, por lo que puede pensarse que la migración desde zonas endémicas hacia el Municipio de La Matanza podría generar casos urbanos. Sin embargo, no hay publicaciones sobre la incidencia de la infección en la población de La Matanza y pocos estudios epidemiológicos han abordado la problemática en este Municipio. Por otro lado, la transmisión vertical de *T. cruzi* ocurre en un 5% de las madres con infección crónica [21]. En Argentina se estima que anualmente nacen alrededor de 1.500 niños infectados [22]. En 2018, el 41,1% de los reportes de enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas corresponden a la PBA [23].

Marco conceptual

Este proyecto se realizará junto con el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatała Chaben” y con el Hospital Paroissien (Isidro Casanova, Partido de La Matanza). Este último recibe anualmente centenares de pacientes con serología positiva para la infección por *T. cruzi*, indicando la alta prevalencia de la infección en el Municipio y su impacto sanitario en la región.

En este proyecto proponemos la validación del uso de una prueba de diagnóstico rápido (PDR), con el objetivo de evaluar su utilidad como método de screening en salidas al territorio, comparándola con los métodos de referencia que se realizan en el laboratorio del hospital. Los resultados obtenidos serán evaluados en el contexto de la parasitemia (medida por PCR en tiempo real) y la población parasitaria infectante (UDT, caracterizada molecularmente).

Metodología

En este proyecto se propone la evaluación en territorio de una PDR de la enfermedad de Chagas y su comparación con el método diagnóstico de referencia y por PCR en tiempo real.

Consideraciones éticas

Este proyecto será sometido a evaluación por el Comité de ética correspondiente. Todos los pacientes que deseen participar deberán firmar el consentimiento escrito informado. El estudio se realizará según las normas nacionales y será conducido respetando las normas de buenas prácticas clínicas vigentes. Los pacientes participantes podrán retirarse del estudio cuando lo deseen y acceder a toda la información obtenida y esto no afectará la atención habitual.

Selección y reclutamiento de pacientes

Se realizará un estudio de cohorte prospectivo observacional. Se invitará a participar a los pacientes que se atienden en el consultorio de Cardiología del Hospital Paroissien.

Se incluirán en el estudio pacientes entre 18 y 75 años de edad. Se excluirán los pacientes que hayan sido tratados con Nifurtimox o Benznidazol, o pacientes inmunosuprimidos.

Diagnóstico de referencia: al momento de la inclusión en el estudio se realizará serología para *T. cruzi* en el Hospital Paroissien según recomendaciones de las guías nacionales de atención de pacientes, utilizando dos pruebas normatizadas en paralelo y una tercera prueba en caso de discordancia [24].

Criterio diagnóstico: se considerará a un sujeto infectado cuando los resultados de dos pruebas serológicas sean concordantes positivos. Se considerará a un sujeto no infectado cuando los resultados de dos pruebas serológicas sean concordantes negativos.

Con respecto al tamaño muestral, se realizará un muestreo por conveniencia de acuerdo de la concurrencia de pacientes al Hospital. El tamaño muestral esperado es de 50 pacientes con serología positiva y 50 con serología negativa [25].

Muestras clínicas

Se extraerá en el ámbito hospitalario una muestra de 8 ml de sangre periférica adicional al volumen de muestra que se requiera para los estudios médicos de rutina.

-Conservación de las muestras para PDR

Para la realización de la PDR se conservarán 3 ml de la muestra de sangre periférica en tubo seco y se centrifugará a 3000 rpm por 10 minutos para separar el suero que se conservará a -20°C hasta su procesamiento en el Instituto Nacional de Parasitología “Dr. Mario Fatala Chaben”. La capacitación del personal estará a cargo del Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatala Chabén.

-Conservación de muestra para qPCR (determinación de parasitemia y UDTs)

Para la realización de las qPCR 5 ml de la muestra de cada paciente serán inmediatamente mezclados en un volumen igual de una solución 6 M Guanidina-Hidrocloruro / 0.2 M EDTA como se explica en [26], codificadas y preservadas a 4°C en el ámbito del Hospital. Posteriormente, las muestras serán enviadas al Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIBio-UNSAM).

-Parasitemia y determinación de poblaciones parasitarias

Extracción de ADN

De la preparación anterior, se utilizarán 200µl para la extracción de los ácidos nucleicos. Se utilizará el kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Quiagen) con menores modificaciones. El tratamiento con proteinasa K y buffer de lisis recomendado por el kit, será omitido de acuerdo a [27], y el paso de elución se realizará mediante el agregado de 100µl del buffer de elución provisto por el kit incubando la columna a temperatura ambiente por 10 min antes del centrifugado para recuperar el ADN [28]. La cantidad y calidad de ADN recuperado de la muestra se analizará mediante absorbancia (A) a 260nm/280nm en Nanodrop.

Determinación de la parasitemia mediante qPCR de secuencias satélites nucleares.

La carga de ADN de *T. cruzi* en las muestras de pacientes se determinará como se describió anteriormente [29]. Este ensayo, se realizará mediante una cuantificación absoluta del ADN de *T. cruzi* en la muestra. Para ello, se realizará una curva estándar con ADN de un donante sano contaminado experimentalmente con cantidades conocidas de ADN de *T. cruzi* obtenido en cultivo de laboratorio [27].

Determinación de las UDTs parasitarias infectantes

La determinación de cada uno de los genotipos de la/s población/es parasitarias de las muestras de sangre será evaluada por triplicado por qPCR. Se utilizarán 6 amplicones para determinar las diferentes UDTs [26,30].

-Evaluación del kit de diagnóstico rápido

Se utilizará la prueba WL Check (Wiener Lab Group) utilizando 40 µL de suero de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los operadores de laboratorio que obtengan los resultados de la PDR no conocerán los resultados del estándar de referencia.

Resultados

Para el abordaje de los objetivos de este proyecto en primer lugar se coordinaron diversas visitas al Hospital Paroissien para entrevistar al grupo de trabajo y armar los consentimientos informados, hoja de información para el paciente, hoja de delegación de tareas y base de datos. Además, se solicitaron las firmas al Director del Hospital Paroissien y se consiguió el aval y recomendación del Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires y de la Dirección Provincial de Hospitales. Todos estos documentos fueron presentados al Comité de Ética del Municipio de La Matanza (COMUBI) y además se brindó un seminario informativo. En la actualidad, estamos esperando la devolución de dicho comité para implementar el uso de los kits de diagnóstico rápido en pacientes.

Conclusiones

Mediante este estudio se espera validar el uso de una PDR como método de screening, utilizando como estándar de referencia los algoritmos de diagnóstico recomendados en las guías nacionales de atención de pacientes con infección con *T. cruzi*, de modo de detectar la infección en centros de atención del primer nivel con baja disponibilidad de equipamiento y tiempo de procesamiento de muestras y durante las salidas de campo a zonas alejadas del Hospital Paroissien. De esta forma, se espera contribuir a que la población de áreas no endémicas del Partido de La Matanza y otras regiones del AMBA, puedan tener acceso a un método que permita detectar la infección por *T. cruzi* de manera rápida.

Además, la aplicación de técnicas diagnósticas simples, como la evaluada en este proyecto, puede contribuir significativamente a la interrupción de la transmisión vertical. En este sentido, el conocimiento del estado serológico por parte de mujeres en edad fértil es fundamental para poder analizar y estudiar a sus hijos recién nacidos o de pocos años de edad, quienes tienen asegurado el éxito terapéutico si son tratados en los primeros años de vida.

También, se espera contar con información epidemiológica respecto a la carga parasitaria y UDTs circulantes en la población con infección por *T. cruzi* de La Matanza que hasta el momento no han sido descritas.

Si bien son cortos los tiempos estimados para la ejecución de este proyecto, los resultados que surjan del presente plan podrían plantear nuevas hipótesis de trabajo. En particular, interesa saber a futuro y, como resultado de la comparación de los métodos diagnósticos que aquí se proponen, si los falsos negativos corresponden a pacientes con baja carga parasitaria o bien si se trata de alguna UDT en particular que dificulte el diagnóstico. Por otro lado, una vez evaluada la efectividad de la prueba rápida, la técnica podrá ser ensayada en pacientes con serología discordante (resultados diferentes entre las diferentes técnicas), los cuales constituyen actualmente un grupo de pacientes que podrían estar siendo mal diagnosticados.

Finalmente, se espera contribuir en la formación de recursos humanos de una estudiante de la UNLAM cuya postulación a beca CIN se encuentra actualmente en evaluación.

Bibliografía

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010;115: 14–21. doi:10.1016/j.actatropica.2009.11.003

WHO (2019) World Health Organization Global health atlas. Available: Chagas disease (American trypanosomiasis) (who.int). 2019 May 28.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002;18: 171–176. doi:10.1016/s1471-4922(01)02200-0

Pissetti CW, Correia D, de Oliveira RF, Llaguno MM, Balarin MAS, Silva-Grecco RL, et al. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5: e976. doi:10.1371/journal.pntd.0000976

Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2004;99: 1–12. doi:10.1590/s0074-02762004000100001

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting

recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104: 1051–1054. doi:10.1590/S0074-02762009000700021

Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C.: OPS; 2018

Pinazo M-J, Gascon J, Alonso-Padilla J. How effective are rapid diagnostic tests for Chagas disease? *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2021;19: 1489–1494. doi:10.1080/14787210.2021.1873130

Khalaf RT, Ford SL. Intestinal failure-associated liver disease in the neonatal ICU: what we know and where we're going. *Curr Opin Pediatr.* 2022;34: 184–190. doi:10.1097/MOP.0000000000001105

Bocchi EA. Heart failure in South America. *Curr Cardiol Rev.* 2013;9: 147–156.

Ministerio de Salud de la Nación. Curso sobre Enfermedades Vectoriales para Agentes Comunitarios en Ambiente y Salud. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000172cnt-08-2-3-3-I-modulo-Chagas.pdf>.

Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373: 456–466. doi:10.1056/NEJMra1410150

Pinazo M-J, Miranda B, Rodríguez-Villar C, Altclas J, Brunet Serra M, García-Otero EC, et al. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. *Transplant Rev (Orlando).* 2011;25: 91–101. doi:10.1016/j.trre.2010.12.002

Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis.* 2009;49: e52-4. doi:10.1086/605091

Ministerio de Salud de la Nación. Curso sobre Enfermedades Vectoriales para Agentes Comunitarios en Ambiente y Salud. Disponible en: <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000172cnt-08-2-3-3-I-modulo-Chagas.pdf>.

Instituto Nacional de Estadística y Censos, Ministerio de Economía, Argentina. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas, Argentina, 2010. Disponible en: <http://www.censo2010.indec.gov.ar/>.

Moscatelli G, García Bournissen F, Freilij H, Berenstein A, Tarlovsky A, Moroni S, et al. Impact of migration on the occurrence of new cases of Chagas disease in Buenos Aires city, Argentina. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7: 635–637. doi:10.3855/jidc.2930

Stagnaro JP, Bernstein JC, Alvarez R. Enfermedad de Chagas en un municipio del conurbano bonaerense. *RAZyEIE Vol. IX N° 3 Diciembre 2014.*

Abal, Y. S., Melella, C. E., & Matossian, B. (2021). Percepciones sobre la diversidad en La Matanza. Reflexiones a partir de la aplicación de una encuesta. *Cuestiones De Sociología*, (25), e123.

<https://senepa.gov.py/2021/07/09/paraguay-refuerza-la-lucha-contrala-enfermedad-de-chagas-con-las-primeras-guias-de-manejo-de-la-patologia/>

Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110: 363–368. doi:10.1590/0074-02760140405

Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 2015;90: 33–43.

Boletín epidemiológico Semanal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. N° 105. Año III/ 24 de Agosto de 2018. https://www.buenosaires.gob.ar/sites/gcaba/files/bes_105-se_32-vf.pdf.

Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedad de Chagas. Guía para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*. 2018.

Clinical & Laboratory Standards Institute. CLSI EP 12-A2 - User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; 2nd Edition, 2021.

Muñoz-San Martín C, Apt W, Zulantay I. Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infect Genet Evol.* 2017;49: 300–308. doi:10.1016/j.meegid.2017.02.006

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: e419. doi:10.1371/journal.pntd.0000419

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: 23–31. doi:10.1016/j.actatropica.2012.08.020

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: 195–200. doi:10.1016/j.actatropica.2007.05.019

Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9: e0003765. doi:10.1371/journal.pntd.0003765