
USO DE LA REACCIÓN EN CADENA

DE LA POLIMERASA PARA EL CONTROL TERAPÉUTICO

DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR *Trypanosoma cruzi*

Carlos Diego Lacunza¹, Olga Sánchez Negrette, María Celia Mora, María Fernanda García Bustos y Miguel Ángel Basombrío

RESUMEN

En las normas actuales de tratamiento etiológico de la fase crónica tardía de la enfermedad de Chagas en Argentina, Brasil y la Organización Mundial de la Salud, se recomienda controlar la eficacia terapéutica con pruebas serológicas y parasitológicas convencionales. Sin embargo las primeras suelen continuar positivas 10 años o más luego del tratamiento, y las segundas son, en general, de baja sensibilidad en esta etapa de la enfermedad. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) al ser más sensible que los exámenes parasitológicos convencionales, podría informar con una cobertura mayor si hubo falla terapéutica. Hemos ofrecido tratamiento con benznidazol (5 mg/kg/día, por 60 días) a 138 pacientes de 16 a 35 años de edad, infectados crónicamente con *Trypanosoma cruzi*. La eficacia terapéutica se controló con PCR periódicas, hemocultivo y serología convencional en dos grupos de pacientes: uno (GT, 57 pacientes) que aceptó y cumplió el tratamiento y otro (GNT, 37 pacientes) que lo rechazó. Antes de la administración de benznidazol la PCR mostró una sensibilidad diagnóstica de 41% (57/138 pacientes) y el hemocultivo 7,2% (10/138). Sesenta meses postratamiento el grupo GT mostró una positividad de PCR acumulada de 28,1% (16/57) y el grupo GNT 54,1% (20/37; p=0.0016). A pesar de que la sensibilidad diagnóstica de PCR es limitada, la negatividad de pruebas repetidas con método normatizado podría evidenciar disminución de la parasitemia o probable curación en 71,9% de los pacientes tratados, lo que habría que confirmar con el seguimiento serológico.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad de Chagas; reacción en cadena de la polimerasa; benznidazol; tratamiento específico; diagnóstico serológico

1 Instituto de Patología Experimental, CONICET, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Salta, Salta, Argentina

Endereço para correspondência:

Recibido para publicación en: 5/1/2015. Revisto en: 14/3/2015. Aceptado en: 16/3/2015.

ABSTRACT

Use of the polymerase chain reaction (PCR) for the therapeutic control of chronic *Trypanosoma cruzi* infection

Current norms for the etiological treatment of chronic Chagas disease, recommended by WHO or currently in force for Argentina and Brazil, advise the control of therapeutic efficacy using conventional serological and parasitological tests. However, serology usually remains positive 10 or more years after treatment and parasitological tests are insensitive in the chronic stage. Polymerase Chain Reaction (PCR) is more sensitive than parasitological tests and could provide earlier evidence of therapeutic failure. We offered benznidazole treatment (5 mg/kg/day, 60 days) to 138 patients (age=16 to 35 years old), chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Therapeutic efficacy was checked with periodic PCR, haemoculture and conventional serology in two groups of patients: One (TG) accepting and complying with treatment and the other (NTG) rejecting it. Before benznidazole administration, PCR displayed a diagnostic sensitivity of 41.3% (57/138) and haemoculture 7.2% (10/138). Sixty months after treatment, TG displayed a cumulated PCR positivity of 28.1% (16/57) and NTG 54.1% (20/37; $p=0.0166$). Even though the sensitivity of PCR is limited, repeated negative results of a standardized method may reveal lower parasitaemia or probable cure, in 71.9% of treated patients, to be confirmed with serological follow up.

KEY WORDS: Chagas disease; PCR; ELISA; drug therapy.

INTRODUCCIÓN

La necesidad del tratamiento etiológico en la fase aguda de la enfermedad de Chagas (ECH) es indiscutida desde hace muchos años. El tratamiento en la fase crónica, de acuerdo principalmente a los resultados de dos estudios (14, 32), se recomienda hasta los 12-14 años de edad (18, 24, 36). En pacientes de mayor edad hay consenso para realizarlo en la fase crónica asintomática o cardíaca incipiente, sin límite de edad (4, 11, 37). Sin embargo el tratamiento en esta etapa de la enfermedad presenta un obstáculo importante: cómo determinar la curación una vez finalizado el mismo. Las guías actuales recomiendan controlar la eficacia terapéutica con métodos convencionales: serológicos y parasitológicos (18, 24, 36). Pero la serología convencional solo se negativiza luego de varios años de finalizado el tratamiento, aún hasta 10 años o más (1, 15). Y los exámenes parasitológicos convencionales como el xenodiagnóstico y el hemocultivo (HC), son en general, de baja sensibilidad en esta fase de la ECH (5).

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (Polymerase Chain Reaction: PCR) ha demostrado ser más sensible que los métodos parasitológicos convencionales en infectados chagásicos crónicos (2, 9, 17, 33, 34). Por lo tanto podría dar información sobre falla terapéutica con una mayor cobertura y en forma precoz. Por otro lado su negatividad en forma repetida, podría indicar disminución de la parasitemia o probable curación, a confirmar con el seguimiento serológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se incorporaron al estudio, con un diseño abierto y de randomización no aleatoria, sujetos con sospecha de ser infectados chagásicos crónicos en fase tardía, por epidemiología, o por presentar una sola prueba serológica positiva para ECH. Los sujetos, de ambos sexos, fueron en su mayoría ingresantes a la Universidad Nacional de Salta, Argentina. Solo se admitieron sujetos de 16 a 35 años de edad. Durante el estudio no tenían posibilidad de infectarse o re-infectarse por ser residentes en área sin transmisión vectorial. A las mujeres en edad fértil se les recomendó poner los recaudos necesarios para no quedar embarazadas durante el tratamiento.

Los criterios de exclusión fueron: tratamiento previo correctamente realizado, embarazo, alteración de transaminasas hepáticas, insuficiencia renal, leucopenia, plaquetopenia, alcoholismo, enfermedad severa asociada con ECH y madres en etapa de lactancia.

El diseño muestral para evaluar eficacia consistió en comparar la positividad de la PCR entre un grupo de pacientes que completó el esquema terapéutico, y otro grupo que rechazó el tratamiento.

Todos los sujetos firmaron Consentimiento Escrito Informado. El proyecto fue aprobado por la Comisión de Bioética de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de Salta. Al momento de realizar nuestra investigación, las normas de tratamiento del Ministerio de Salud de la Argentina (25), incluían entre sus indicaciones a pacientes en la etapa indeterminada de la ECH, sin límite de edad.

Se realizó tratamiento etiológico con benznidazol (BZL), 5 mg/kg/día vía oral, durante 60 días, en dos tomas diarias, con dosis crecientes al inicio, durante 4 días. Se clasificó a los efectos adversos (EA) al BZL en: leves, si no requerían interrumpir el tratamiento y remitían espontáneamente; moderados, con interrupción transitoria del tratamiento (no mayor a 14 días) y/o uso de medicación sintomática; y severos, cuando requerían suspender completamente el tratamiento (37).

Para la confirmación serológica de la infección se utilizó Hemoaglutinación Indirecta (HAI; Chagatest-HAI, Laboratorio Wiener, Argentina) y Enzaimunoen ensayo (Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA; Chagatest-ELISA, Laboratorio Wiener, Argentina), según se ha descrito previamente (20). Para las comparaciones pre y post-tratamiento, las muestras fueron analizadas por un mismo operador, en la misma fecha y con el mismo lote de kit.

Antes del tratamiento, a todos los pacientes se les realizó anamnesis, examen físico, ECG, PCR, HC y análisis clínicos (hemograma, dosajes de urea y creatinina, y hepatograma). Durante el tratamiento se citó a los pacientes semanal o quincenalmente para entregarles la medicación y evacuar sus dudas. El día 30 del tratamiento se les realizó a los pacientes hemograma, dosaje de urea y creatinina, y hepatograma. Al mes de haber terminado el tratamiento se realizó PCR y HC. Luego, cada 6 meses se repitieron la PCR y el HC, y se realizó también HAI

y ELISA, conjuntamente con anamnesis, examen físico y ECG. A los sujetos infectados que no aceptaron el tratamiento se les ofrecieron todos los exámenes pre-tratamiento del Grupo Tratamiento (GT), y controles periódicos mensuales y semestrales. Con este grupo se conformó el grupo de pacientes no tratados (GNT).

Para PCR y HC se siguió el protocolo descrito con anterioridad (26). Para PCR se extrajo ADN de 100 µL de una muestra de 5 mL de sangre conservada v/v en buffer 6M guanidina-HCl/0.2M EDTA, utilizando los cebadores 121 y 122, que amplifican un segmento de 330 pares de bases del minicirculo del ADN cinetoplástico del *T. cruzi*.

Se utilizó un electrocardiógrafo de un canal, Cardiosuny 501 B, con velocidad de 25 mm/s y sensibilidad 1 cm/mv, para la realización de los ECG, obteniéndose las 12 derivaciones standard. La interpretación de los registros de ECG fue realizada por dos cardiólogos en forma independiente.

Para los análisis estadísticos se utilizaron los Test Chi Cuadrado, Exacto de Fisher y la elaboración de curvas de Kaplan-Meir, con el programa estadístico Graph Pad Prism, versión 5.03.

RESULTADOS

Selección de cohortes. Sensibilidad de PCR y HC

En la Figura 1 se resume el flujograma de seguimiento de los pacientes del estudio. Se entrevistaron 208 sujetos con sospecha de ser portadores de infección crónica tardía por *T. cruzi*: 130 sujetos de sexo femenino, y 78 de sexo masculino. En 182 de ellos se repitió la serología con HAI y ELISA: 148 (81,3 %) presentaron resultado positivo; 34 (18,7 %) presentaron serología negativa. Se realizó PCR y HC en 138 pacientes con serología positiva, presentaron PCR positiva 57 (41,3%); y HC positivo 10 (7,2%; Tabla 1). Se inició tratamiento con BZL en 101 pacientes, 64 de sexo femenino y 37 de sexo masculino. Completaron el tratamiento 79, de los cuáles 57 tuvieron seguimiento suficiente (GT). Con 37 pacientes que no aceptaron el tratamiento se conformó el grupo no tratado (GNT).

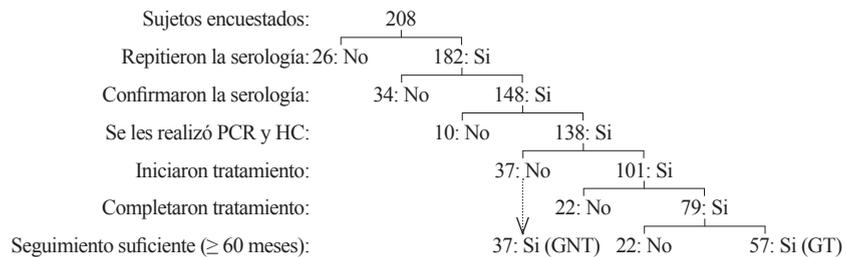


Figura 1. Flujograma de selección y seguimiento de cohortes

Tabla 1. Resultados de PCR y HC Pretratamiento

HC		PCR		Totales
		Positivo	Negativo	
	Positivo	5	5	10
	Negativo	52	76	128
	Totales	57	81	138

Previo a la administración de BZL, se realizó una PCR al GT, hallándose una positividad de 38,6 % (22/57), similar a la de la PCR inicial en el GNT (35,1 %; 13/37; Tabla 2). Se normatizó como “día 0” para el comienzo del seguimiento, al día de finalización del tratamiento en el GT y al día de toma de muestra de la PCR inicial en el GNT.

Tabla 2. Número acumulado de pacientes tratados y no tratados que positivizaron alguna PCR en períodos semestrales.

Tratados													
Meses post-tratamiento	Pre-tratamiento	1	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	>60
Nº acumulado de ptes PCR+/57	22	6	7	10	11	13	13	14	15	15	15	16	16
% acumulado de ptes PCR+	38,6	10,5	12,3	17,5	19,3	22,8	22,8	24,6	26,3	26,3	26,3	28,1	28,1
No tratados													
Meses post-tratamiento	0	1	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	>60
Nº acumulado de ptes PCR+/37	13	14	15	16	17	17	18	18	18	19	20	20	20
% acumulado de ptes PCR+	35,1	37,8	40,5	43,2	46	46	48,7	48,7	48,7	51,4	54,1	54,1	54,1

Eficacia del tratamiento

Después del tratamiento (período de seguimiento de >60 meses) se obtuvieron y analizaron periódicamente 226 muestras provenientes del GT, las cuales se compararon con 51 muestras del GNT, encontrándose al final del seguimiento una positividad acumulada (alguna PCR positiva) de 28,1% (16/57) en el GT y de 54,1% (20/37) en el GNT ($p=0,0166$; Tabla 2).

Tomando al número de muestras analizadas por PCR y no a los pacientes como unidad de análisis (Tabla 3), se observó que durante todo el seguimiento, las tasas semestrales acumuladas de positivización de la reacción fueron marcadamente inferiores (aproximadamente 1/3) en el GT (Figura 2). Al cabo de >60 meses de seguimiento, positivizaron 22/226 (9,7%) reacciones en el GT y 19/51 (37,3%) en el GNT ($p<0,0001$; Tabla 3).

No se encontró positividad en ninguno de los HC realizados en el seguimiento en el GT y en el GNT. En los pacientes tratados se hicieron un total de 229 pruebas de HC en el post-tratamiento.

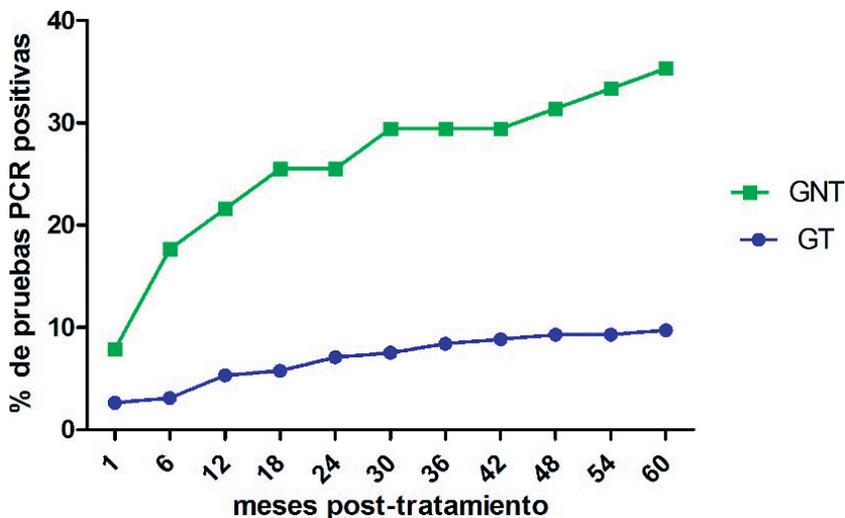


Figura 2. Acumulación semestral (%) de pruebas PCR positivas durante 60 meses de seguimiento.

Tabla 3. Número acumulado de muestras PCR positivas obtenidas durante el seguimiento de pacientes tratados y no tratados.

Tratados													
Meses post-tratamiento	0	1	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	>60
Pruebas PCR+ acumuladas		6	7	12	13	16	17	19	20	21	21	22	22
% pruebas PCR+/226		2,7	3,1	5,3	5,8	7,1	7,5	8,4	8,8	9,3	9,3	9,7	9,7
No tratados													
Meses post-tratamiento	0	1	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	>60
Pruebas PCR+ acumuladas		4	9	11	13	13	15	15	15	16	17	18	19
% pruebas PCR+/51		7,8	17,6	21,6	25,5	25,5	29,4	29,4	29,4	31,4	33,3	35,3	37,3

Serología

Todas las pruebas ELISA realizadas en el seguimiento de los sujetos tratados y no tratados fueron positivas. Tampoco con HAI hubo seroconversión.

Efectos adversos

En 73/101 (72,3%) de los pacientes tratados se observaron EA: 60,3% fueron leves; 34,6% fueron moderados; y 5,1% severos. Los EA más frecuentes fueron: erupción cutánea (maculo-papular o puntiforme): 15,4%; cefalea: 14,1%; y prurito: 10,9%. 51/73 (69,9%) de los pacientes que presentaron EA

puieron completar el esquema terapéutico, ya que la mayoría de los EA cedió espontáneamente o con maniobras clínicas sencillas. De los 22 pacientes restantes, 18 (26,7%) abandonaron el tratamiento por su cuenta, y a 4 (5,5%) se le suspendió por EA severos.

ECG

Entre los 148 pacientes a los cuales se les confirmó serología positiva para ECH, se encontró que 10/97 (9,7%) presentaron alguna alteración en el ECG, al inicio del seguimiento. Los hallazgos encontrados fueron los siguientes: Bradicardia sinusal (<50 pulsaciones por minuto) n=3; Hemibloqueo izquierdo anterior n=3; Bloqueo completo de rama derecha n=2; Bloqueo incompleto de rama izquierda n=2; Extrasístolia ventricular n=1. Durante el seguimiento no hubo cambios en los ECG realizados.

DISCUSIÓN

El presente estudio estuvo dirigido a establecer la utilidad de la PCR en el diagnóstico y seguimiento post-terapéutico de la infección crónica por *T. cruzi*. Ha brindado también datos sobre la sensibilidad relativa de la PCR en comparación con el HC y la serología.

La sensibilidad del HC en este trabajo fue de 7,2%. En otros estudios, para la fase crónica de la ECH, se encontró una sensibilidad muy variable: entre 0 y 94%, dependiendo del método y grupo de pacientes (3, 10, 17, 22). En nuestras manos la sensibilidad del HC resultó baja y por lo tanto no recomendable para el seguimiento del tratamiento de pacientes crónicos adultos.

La PCR presentó una sensibilidad significativamente superior al HC. Además, cuando se realizó repetidamente sobre el mismo paciente, aumentó la sensibilidad global pero observándose un efecto de meseta en la curva de positividad acumulada (Figura 2). Determinaciones previas de la sensibilidad comparada del HC versus PCR, hechas por nuestro laboratorio (26), indicaron que la técnica de PCR usada en este trabajo, detectaba concentraciones de *T. cruzi* en sangre, aproximadamente 10 veces menores que las detectadas por HC. Esto se confirmó en los pacientes de nuestro estudio, ya que entre 138 de ellos, analizados por ambas técnicas (Tabla 1), el HC detectó 5 de los 57 sujetos con PCR positiva, una proporción similar a la del estudio antes citado.

La sensibilidad diagnóstica de la PCR en nuestro estudio comparándola con la serología convencional, fue de 41,3% (Tabla 1). Avila y col. (2) reportaron una sensibilidad de la PCR del 100% en infectados crónicos. Sin embargo no queda claro en ese estudio que no hubiera infectados agudos, que tienen una parasitemia mayor que los crónicos. En otros estudios la sensibilidad varió de 4,5 a 96,5 % (6, 17, 19, 28, 29, 33, 34, 35). Tal rango de diferencias en la sensibilidad en los distintos

estudios, puede deberse a las diferencias genéticas entre los distintos linajes de *T. cruzi* (5). Por ejemplo en Bolivia y la mayor parte de Brasil, donde circula *T. cruzi* II [TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI, de la nomenclatura actual (38)], hay una mayor sensibilidad de la PCR, comparado con áreas del Amazonas en Brasil y México, donde circula *T. cruzi* I (2, 12, 33, 34, 35). En la región geográfica correspondiente a la población de nuestro trabajo el linaje predominante es TcV, pero también están presentes en humanos TcII, TcI y en muy menor medida TcVI (13).

Por otro lado hay elementos inherentes a la técnica de PCR que hacen diferir la sensibilidad: cantidad de sangre colectada y número de muestras por paciente, la secuencia genética usada como blanco, los cebadores utilizados y el método utilizado para la extracción de ADN. También hay que tener en cuenta las características de la población estudiada, y la presencia intermitente de parasitemia en la infección crónica (12).

En el transcurso de esta investigación hemos encontrado algunas discrepancias de resultados entre diferentes determinaciones, y en particular 5 casos de HC positivo con PCR negativa entre 138 muestras de pacientes, tomadas antes del tratamiento (Tabla 1). En un trabajo previo de nuestro Instituto, utilizando sangre de cordón umbilical para diagnóstico en Chagas congénito (26), también se habían detectado 8 muestras con HC positivo y PCR negativa entre 235 muestras analizadas. Se procedió a reanalizar esos casos, sometiendo a varios de ellos a nuevas extracciones de ADN, a reacción repetida y a búsqueda de factores inhibitorios de la PCR. Luego de nueva extracción, 3 muestras resultaron PCR positivas, y en otras 3 se pudieron demostrar factores inhibitorios de la PCR, ya que esas 3 muestras negativizaron reacciones PCR calibradas para obtener PCR positiva con mínima cantidad de ADN. Por lo tanto, las reacciones PCR con resultado falso negativo encontradas ocasionalmente al procesar elevado número de muestras de sangre, pueden atribuirse a extracción insuficiente de ADN ó a factores inhibitorios. Para descartar esto último algunos autores han utilizado PCR para detectar el gen humano de β Globina (33) o β Actina (23). En el momento de nuestro estudio no hemos empleado este control, sin embargo, en un estudio comparativo a ciego (30), en que se sometieron muestras normatizadas a procesamiento por varios laboratorios de América y Europa, nuestro método de PCR se clasificó entre aquellos de valores más elevados de sensibilidad y especificidad.

Para evaluar la utilidad de la serología convencional en el control post-terapéutico, se examinaron con HAI y ELISA las muestras de los pacientes durante 75 meses de seguimiento, constatando que no hubo seroconversión negativa en los individuos tratados. En cuanto a la evaluación de la utilidad de la PCR en el control de la eficacia terapéutica, se han comparado en éste y otros estudios las tasas de positividad de la PCR antes y después del tratamiento etiológico. Durante el seguimiento de nuestros pacientes, en el 71,9 % de los tratados resultaron negativas todas las PCR con que se los estudió (Tabla 2). En estudios previos de nuestro grupo de trabajo (26), se constató –utilizando diluciones artificiales de *T. cruzi* en sangre–,

que la técnica PCR aquí usada detecta concentraciones cercanas a 1 parásito/mL de sangre. La frecuencia de positividad indica que, antes del tratamiento, sólo 57/138 (41,3%) de nuestros pacientes (Tabla 1) tenía parasitemias iguales o mayores a las indicadas. Y después del tratamiento, sólo 22 de 226 pruebas de PCR (9,7%) tuvieron esos niveles en sangre (Tabla 3), lo que indicaría una reducción o posiblemente la eliminación de la parasitemia en estos pacientes. Esto podría constituir un marcador de cura, pero se debe aún seguir a dichos pacientes con pruebas serológicas, para constatar la curación.

En estudios similares, otros autores han evaluado con PCR a pacientes infectados crónicos, tratados. En la mayoría de los estudios se observó que luego del tratamiento aún se encontraban pacientes con PCR positiva, sobre todo cuando se analizaban múltiples muestras de cada sujeto. La proporción de pacientes PCR+ post-tratamiento en nuestro estudio (28,1%, Tabla 2), ha sido similar al encontrado en otro estudio: 28,1% (7); y menor que el hallado en otros trabajos: 35% (8), 57,4% (31) y 88,8% (16). Este porcentaje depende de múltiples factores (edad, forma clínica, tratamiento, muestreo, etc.), llegando a proporciones tan altas como 100%, en un trabajo en que se trató a 45 infectados crónicos con severas alteraciones electrocardiográficas (21), ó tan bajas como 6,9%, en otro trabajo que incluyó niños infectados y seguidos durante sólo 420 días (27). En el trabajo de Schijman y cols. (31) se aplicaron PCR periódicas hasta 36 meses postratamiento y, lo mismo que en nuestro estudio, también se constató el hallazgo de más casos PCR positivos en la medida que se repetían más reacciones sobre el mismo paciente.

En nuestra investigación se compararon con PCR pacientes tratados (GT) y no tratados (GNT). Estos últimos habían rechazado el tratamiento, pero accedieron a controles de seguimiento. Observamos, en primer lugar, que la proporción de PCR positivo sobre el total de reacciones realizadas era mayor en el GNT que en el GT (19/51; 37,3% vs. 22/226; 9,7%, $p < 0,0001$; Tabla 3). Además, la tasa acumulada de pacientes con alguna reacción positiva, medida en períodos semestrales, fue mayor en el GNT (20/37; 54,1%) que en el GT (16/57; 28,1%; $p = 0,0166$; Tabla 2). Estas diferencias entre GNT y GT no fueron observadas en otro estudio (8) que incluyó 45 pacientes crónicos no tratados.

Este es el primer estudio de tratamiento etiológico en infectados chagásicos crónicos adultos cuyo seguimiento, en forma repetida, se ha hecho simultáneamente con PCR, HC y serología convencional. Los seguimientos clínicos a largo plazo presentan muchas veces la dificultad de la pérdida de algunos controles. Esto sucedió en nuestro trabajo especialmente con el GNT. Hay que tener en cuenta las características de la población en estudio: muchos de ellos eran ingresantes en la Universidad y varios abandonaron su carrera universitaria; los que presentaron EA fueron más rebeldes a concurrir a los controles; por otro lado los pacientes del GNT al no querer recibir tratamiento etiológico, demostraron ser menos comprometidos para asistir a los controles. Este problema se trató de subsanar con citaciones por correo, por teléfono, e incluso acudiendo a los domicilios de los pacientes.

El 28,1% de los sujetos del GT presentaron falla terapéutica por PCR. Usando la serología convencional esta información se suele obtener 10 años o más postratamiento. De este modo los pacientes quedan librados a la evolución natural de la enfermedad, ese período de tiempo, con las consecuencias negativas que esto puede tener. La evidencia de falla terapéutica, obtenida por PCR, permite recurrir, en forma más precoz, a otras alternativas de tratamiento.

Agradecimientos

A los técnicos de laboratorio: Alejandro Uncos y Federico Ramos. A los Médicos: Néstor del Castillo; María I. Garayzabal, Alberto Robredo y Tomás Museli. A la Dra. Carolina Davies. A los laboratorios Wiener y Andrómaco, por la provisión de material de diagnóstico y tratamiento, respectivamente. Este trabajo fue patrocinado por subsidios de: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica (PICT 1999 N° 05-05070); y de Howard Hughes Medical Institute.

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

1. Andrade SG, Freitas LA, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull World Health Organ* 69: 191-197, 1991.
2. Avila HA, Borges Pereira J, Thiemann O, De Paiva E, Degrave W, Morel CM, Simpson L. 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* 31: 2421-2426, 1993.
3. Barbosa W, Czerewuta AC, Oliveira RL. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores. *Rev Patol Trop* 12:155-163, 1983.
4. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 364: 2527-2534, 2011.
5. Britto C. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 122-135, 2009.
6. Britto C, Cardoso A, Ravel C, Santoro A, Pereira JB, Coura JR, Morel CM, Wincker P. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Exp Parasitol* 81: 462-471, 1995.
7. Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *J Parasitol* 110: 241-247, 1995.
8. Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macêdo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 823-826, 2001.
9. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88: 894-900, 2002.
10. Chiari E, Dias JCP, Lana M, Chiari CA. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19-23, 1989.

11. Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 641-645, 2011.
12. Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 3-24, 2002.
13. Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, Lejona S, Brusés BL, Hernández DO, Severini GV, Velazquez E, Duffy T, Anchart E, Lattes R, Altchek J, Freilij H, Diez M, Nagel C, Vigliano C, Favaloro L, Favaloro RR, Merino DE, Sosa-Estani S, Schijman AG. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology* 139: 516-521, 2012.
14. de Andrade ALS, Zicker F, de Oliveira RM, Almeida Silva S, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, de Andrade SS, de Andrade JG, Martelli CM. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet* 348: 1407-1413, 1996.
15. Duffy T, Bisio M, Altchek J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3: e419, 2009.
16. Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, Romanha A. Efficacy of benznidazole treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 27-32, 2009.
17. Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg* 60: 205-210, 1999.
18. Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud de la Nación. Buenos Aires, 2012.
19. Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90: 129-132, 1996.
20. Lacunza CD, Sánchez Negrette O, Mora MC, Uncos A, Segura MA, Del Castillo N, Garayzabal MI, Basombrio MA. Use of the polymerase chain reaction (PCR) for early evaluation of etiologial treatment in young adults, chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Patol Trop* 35: 227-232, 2006.
21. Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simões-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira AR. Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg* 63: 111-118, 2000.
22. Luz ZMP, Coutinho MG, Cançado JR, Kretzli AU. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 27:134-138, 1994.
23. Maniatis T, Fritsch E, Sambrook T. Extraction, purification and analysis of Messenger RNA from eukaryotic cells. In: *Molecular cloning. An laboratory manual*. Cold Spring Harborg Laboratory, New York, 1989.
24. Ministério da Saúde do Brasil. Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 1-29, 2005.
25. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Resolución Secretaría de Programas de Salud/ Ministerio de Salud y Acción Social de Argentina N° 28/99, Buenos Aires, 1998.
26. Mora MC, Sánchez Negrette O, Marco D, Barrio A, Ciaccio M, Segura MA, Basombrio MA. Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol* 91:1468-1473, 2005.
27. 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* 65: 1759-1754, 2010.
28. Ramirez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, Restrepo S. Evaluation of Adult Chronic Chagas' Heart Disease Diagnosis by Molecular and Serological Methods. *J Clin Microbiol* 47: 3945-3951, 2009.

29. Ribeiro-dos-Santos G, Nishiya AS, Sabino EC, Chamone DF, Saez-Alquézar A. An improved, PCR-based strategy for the detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples. *Ann Trop Med Parasitol* 93: 689-694, 1999.
30. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hijar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ldzins J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11: e931, 2011.
31. Schijman AG, Grippo V, Bisio M, Ayala V, Callejos R, Elean JC, Mujica H, Contreras A, Bentancor ME, Lopez C, Lafon S, Burgos JM, Levitus G, Levin MJ. "Vivir sin Chagas" Project: follow-up of infected patients treated with Benznidazole at the city Añatuya, Santiago del Estero, Argentina. *Biocell* 28: 328, 2004.
32. Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM Velazquez E, Porcel BM, Yamptotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg* 59: 526-529, 1998.
33. Wincker P, Britto C, Borges Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 51: 771-777, 1994.
34. Wincker P, Telleira J, Bosseno MF, Cardoso MA, Marques P, Yaksic N, Aznar C, Liegeard P, Hontebeyrie M, Noireau F, Morel CM, Breniere SF. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in a active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *J Parasitol* 114: 367-373, 1997.
35. Wincker P, Bosseno MF, Britto C, Yaksic N, Cardoso MA, Morel CM, Brenière SF. High correlation between Chagas disease serology and PCRbased detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Immunol Med Microbiol* 124: 419-423, 1994.
36. World Health Organization Expert Committee. *Control of Chagas Disease*. WHO technical report series 905. Brasilia, 2002.
37. Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, Roddy P, Parreño F, Albajar Viñas P, Palma P. Feasibility, Drug Safety, and Effectiveness of Etiological Treatment Programs for Chagas Disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-Year Experience of Médecins Sans Frontières. *Plos Neglected Tropical Diseases* 3: e488, 2009.
38. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:1051-1054, 2009.