



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Genotipificación de *Trypanosoma cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas - megacolon

Lilian Victoria Pinto Rocha

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



**GENOTIPIFICACIÓN DE *TRYPANOSOMACRUZIEN*
PACIENTES CON ENFERMEDAD
DE CHAGAS - MEGACOLON**

Lilian Victoria Pinto Rocha

Programa de Doctorado en Medicina e Investigación Traslacional
Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud
Universidad de Barcelona

2024

DEDICATORIA

*“A mi familia, por su apoyo y aguante
durante todo el trabajo aquí presentado”*

en especial a mis niñas:

“Sofia Leyre, Ariana Berenice”.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación CEADES e ISGlobal, por apoyar y respaldar la realización del doctorado.

A la Universidad de Barcelona, por su estrecha colaboración por medio del gran equipo de profesionales que contribuyeron en el desarrollo del programa de doctorado.

A mis directores de tesis Dr. Joaquim Gascón, Dr. Faustino Torrico y a mi tutor Jordi Vila les agradezco muy profundamente por su dedicación y paciencia. Sin sus palabras y correcciones precisas no hubiese podido lograr llegar a esta instancia tan anhelada. Gracias por su guía y todos sus consejos, los llevaré grabados para siempre en la memoria en mi futuro profesional.

Me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a Dr. Alejandro Schijman Investigador principal de CONICET y director del laboratorio de Biología Molecular de la enfermedad de Chagas (INGEBI-CONICET) de Buenos Aires Argentina y al Dr. Julio Alonso-Padilla, Director e investigador principal de la Iniciativa Chagas, del Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal), sin ustedes y sus virtudes profesionales este trabajo no lo hubiese logrado. Sus consejos fueron siempre útiles cuando para escribir lo que hoy he logrado por su apoyo técnico y profesional que sin duda fue primordial para la ejecución y culminación del trabajo en las pruebas.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a la Dra. María Jesús Pinazo por haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo la presente propuesta que fue un importante, y primordial aporte para el desarrollo de esta tesis.

Quiero expresar mi agradecimiento a los centros especializados que colaboraron en la inclusión de los pacientes que aceptaron ser incluidos en los estudios: Hospital Gastroenterológico Boliviano Japonés, Fundación Pietro Gamba de Anzaldo y Hospital Manuel Ascencio Villarroel de Punata por haberme brindado la oportunidad de trabajar con la tranquilidad de saber que cuento con su respaldo siempre que lo he necesitado.

A mis compañeros de trabajo, por recorrer juntos este camino difícil, pero al final, gratificante.

Es justo dejar una nota de agradecimiento a todos los pacientes que aceptaron ser parte del estudio.

Por su puesto mi gratitud eterna a mi familia que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades por su incondicional apoyo y aliento durante este tiempo y en todos los momentos más difíciles de mi vida, querida Mamita Primitiva Diosito te bendiga cuida siempre, adorado hermano Jimmy mi ejemplo a seguir, ¡amado esposo Adolfo por tu paciencia y aliento y los que están en mi corazón: Papi Tifrón, Abues Leoniza, Jose... desde donde estén, siempre vigilantes!

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN.....	22
1.1 Generalidades de la Enfermedad de Chagas.....	22
1.2 Epidemiología de la enfermedad de Chagas.....	23
1.3 Patología y manifestaciones clínicas	25
1.3.1. Fase aguda	25
1.3.2 Fase crónica	26
1.3.2.1 Forma cardíaca.....	26
1.3.2.2 Forma digestiva.....	27
1.3.2.3 Daño tisular relacionado directamente con la presencia del parásito	27
1.4. Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
1.4.1 Morfología y formas evolutivas	28
1.4.2 Ciclo biológico.....	29
1.5. Vías de transmisión	31
1.5.1 Transmisión vectorial	32
1.5.2. Transmisión congénita	34
1.5.3 Transmisión por vía transfusional de hemoderivados.....	35
1.5.4. Transmisión por trasplante de órganos	35
1.5.5 Transmisión oral.....	36
1.6. Diagnóstico.....	36
1.6.1 Métodos parasitológicos	37
1.6.1.1 Métodos parasitológicos directos.....	37
1.6.1.2 Métodos Parasitológicos Indirectos.....	39
1.6.1.3 Métodos moleculares.....	40
1.6.1.4 Métodos inmunológicos	44
1.7. Tratamiento.....	46
1.8. <i>Trypanosoma cruzi</i> y diversidad genética	46
1.8.1 Unidades Discretas de Tipificación (UDT) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
1.8.2 Genotipado de <i>T. cruzi</i> por Multilocus PCR Convencional a partir de muestras clínicas	48
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	50
2.1. HIPÓTESIS	50
2.2. OBJETIVOS.....	50
2.2.1 Objetivo general.....	50
2.2.2 Objetivos específicos.....	50
III. MATERIAL Y MÉTODOS	51
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	61
3.1 Población analizada.....	61

3.1.1	Diseño del estudio, inclusión de participantes y periodo de estudio.....	61
3.2	Métodos	62
3.2.1	Comités de Ética.....	62
3.2.2	Recolección, extracción y conservación de muestras.....	62
3.2.2.1	Muestras de sangre entera.....	62
3.2.2.2	Muestra de tejido del tracto digestivo (megacolon)	62
3.2.3	Técnicas de diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i> empleadas según el tipo de muestra clínica.	63
3.2.3.1	Serología Chagas	63
3.2.3.2	Cultivo de tejidos.....	64
3.2.3.3	Métodos Moleculares.....	64
3.2.3.4	Extracción y purificación del ADN a partir de muestras clínicas (sangre y tejido)	65
3.2.3.5	PCR en tiempo real para la detección de <i>T. cruzi</i>	66
3.2.3.6	Tipificación mediante estrategias de amplificación de las UDTs de <i>T. cruzi</i>	67
3.4	Análisis estadístico.....	68
IV.	RESULTADOS	70
4.	Resultados.....	71
4.1	Pacientes incluidos en estudio	71
4.2	Cultivos de tejido en medio LIT.....	72
4.3	Extracción de ADN.....	72
4.4	PCR en tiempo real para la detección de <i>Trypanosoma cruzi</i>	73
4.5	Unidades Discretas de Tipificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> identificados en las muestras de sangre y tejido.....	76
V.	DISCUSIÓN	79
VI.	CONCLUSIONES	82
VII.	BIBLIOGRAFÍA	85
VIII.	ANEXOS	101

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Procedimientos de laboratorio según el tipo de muestras clínicas colectadas. Pág. 63	
Tabla 2. Escala del índice kappa para la respectiva interpretación. (Altman DG. Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall; 1991)..... Pág. 69	
Tabla 3. Clasificación de la cohorte de estudio en términos de lecturas clínicas y serológicas. Pág. 71	
Tabla 4. Detalle de pacientes en los que no se recolectó alguna muestra clínica Pág. 72	
Tabla 5. Carga parasitaria expresada en copias de satADN Eq.Tejido/mg de <i>T. cruzi</i> en los sitios de recolección de tejidos y diferentes formas clínicas de EC digestiva. Pág. 75	
Tabla 6. Genotipos (UDTs) de <i>T. cruzi</i> en muestras de sangre y tejido de pacientes con megacolon chagásico con qPCR positiva. ND: no determinada; 0: muestra no analizada para UDTs por PCR negativa. Pág. 78	

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879–1934), junto a una paciente. (Imagen extraída de https://www.meer.com/es/75684-carlos-chagas).....	Pág. 23
Figura 2. Casos estimados de Chagas a nivel mundial. (Imagen extraída de https://elpais.com/elpais/2015/04/10/planeta_futuro/1428680706_109364.html#)	Pág. 24
Figura 3. Localización y morfología de <i>T. cruzi</i> en sus estadios. (Imagen extraída de “Peña <i>et al.</i> , 2022”).	Pág. 29
Figura 4. Representación del ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> y reservorios. (Imagen modificada de Peña <i>et al.</i> , 2022).....	Pág. 31
Figura 5. Vinchuca adulta (<i>Triatoma infestans</i>), vector de transmisión de <i>T. cruzi</i> . Imagen extraída de Médicos sin fronteras, 2016.	Pág. 32
Figura 6. Zona peri domiciliar de viviendas de zona rural OTB Esquilan Agraria Colcapirhua Cochabamba Bolivia. Imagen Propia Cochabamba Bolivia 2022.....	Pág. 33
Figura 7. Transmisión vertical o congénita. Imagen extraída “OPS 2023”: https://who.canto.global/v/UM8U4JCMQL/album/SURCN?auth=sso&viewIndex=0 ..	Pág. 34
Figura 8. Diagrama de métodos parasitológicos directos para el diagnóstico de la infección aguda por <i>T. cruzi</i> . (Imagen extraída de Longhi & Schijman 2022).....	Pág. 38
Figura 9. Diagrama de métodos parasitológicos indirectos para el diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i> . Imagen extraída Longhi & Schijman 2022.	Pág. 40
Figura 10. Diagrama de métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por <i>T. cruzi</i> . Imagen extraída de “Longhi & Schijman 2022”.....	Pág. 42
Figura 11. Esquema de las repeticiones en tándem del ADNsat. Imagen del minicírculo extraída de Schijman., 2015 y esquema del minicírculo extraído y modificado de Ryan y col.,1988).	Pág. 43
Figura 12. Diagrama de métodos serológicos para el diagnóstico de la infección crónica por <i>T. cruzi</i> . Imagen extraída “Longhi & Schijman 2022”.	Pág. 45
Figura 13. Distribución de las UDTs de <i>T. cruzi</i> , en ciclos de transmisión doméstica y selvática. Imagen extraída Zingales <i>et al.</i> , 2012.....	Pág. 47
Figura 14. Sobrenadante de muestras de tejido pulverizado y digerido con tampón de lisis utilizado para la extracción y purificación del ADN (fuente propia).	Pág. 65
Figura 15. Diagrama de identificación de las UDTs de <i>T. cruzi</i> por PCR multilocus. (Esquema adaptado de “Burgos <i>et al.</i> , 2007”).	Pág. 68

Figura 16. Sensibilidad de la qPCR en relación a las muestras de tejido analizadas de pacientes incluidos en el presente estudio. Pag. 73

Figura 17. Amplificación de gen humano ARNasa P como control interno de la qPCR.Pag. 74

Figura 18. Media de la carga parasitaria detectada en muestras de sangre según el diagnóstico clínico..... Pag. 75

Figura 19. Media de la carga parasitaria detectada en muestras de tejido según el diagnóstico clínico..... Pag. 76

Figura 20. Amplicones identificados según la diana de amplificación de las UDTs de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido. Pag. 77

ÍNDICE DE ANEXOS

<u>Anexo 1. Artículo publicado</u>	Pag. 101
------------------------------------------	----------

Lista de abreviaturas y siglas

A10	Fragmento nuclear A10
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNk	ADN del quinetoplasto
ADNmt	ADN mitocondrial
ADNn	ADN nuclear
ADNr 18S	ADN ribosomal 18S
ADNr 24Sα	ADN ribosomal 24S α
ADNsat	ADN satélite
AMCHA	Iniciativa Amazónica para la enfermedad de Chagas
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
BNZ	Benznidazol
pb	Pares de bases
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
Cq	Ciclo de cuantificación
Ct	Umbral de ciclos o cycle threshold
EC	Enfermedad de Chagas
ELISA	Ensayo inmuno-enzimático
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
Kb	Kilobase
mL	Mililitros
MTq-PCR	Algoritmo de PCR cuantitativa múltiple con sondas TaqMan
n-PCR	Nested PCR (PCR anidada)
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification (amplificación isotérmica de ADN mediada por asas)
LIT	Liver infusion tryptose
NFX	Nifurtimox
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/ World Health Organization
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa o a tiempo real
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RFLP	Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción
SAPA	Shed acute-phase antigen (antígenos secretados en fase aguda)
SNC	Sistema nervioso central
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UDT	Unidad Discreta de Tipificación
UV	Ultravioleta

Z1	Zimodema 1
Z2	Zimodema 2
Z3	Zimodema 3

ENUMERACIÓN DE LOS ARTÍCULO- LOS DE LA TESIS

**“Tesis en formato clásico
con artículo publicado anexado”.**

Artículo anexado:

Molecular detection and parasite load of *Trypanosoma cruzi* in digestive tract tissue of Chagas disease patients affected by megacolon.

Lilian Pinto, Alejandro G. Schijman, Julio Alonso-Padilla, Daniel Lozano, Mary Cruz Torrico, Pietro Gamba, Margarita Torrez, Vania Lozada, Karina Cartagena, Jareth Sanchez, Faustino Torrico, Joaquim Gascón. Acta Trop. 2022; 235:106632. FI: 2,7; Q2.

RESUMEN

RESUMEN

La enfermedad de Chagas (EC) es causada por el protozooario *Trypanosoma cruzi*, y afecta a 6-7 millones de personas en 21 países de América. La EC tiene diferentes formas de transmisión, siendo la vectorial y la vertical las más frecuentes. Entre las principales complicaciones de la enfermedad figuran las afectaciones cardíacas, que afectan a un 30%-35% de afectados y las digestivas, que afectan a un 10%-20% de personas con la infección por *T. cruzi*. Los síntomas crónicos de la enfermedad aparecen décadas después de la infección. En 2009, un consenso internacional clasificó las cepas de *T. cruzi* en seis unidades discretas de tipificación (UDT): TcI a TcVI. Las infecciones mixtas son muy frecuentes. La capacidad infectiva, el tropismo tisular variable y la sensibilidad al tratamiento antiparasitario son atribuidos a la variabilidad genética y al gran polimorfismo que exhiben los clones del parásito.

El objetivo de este trabajo es caracterizar las UDT de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido de 40 pacientes con afección digestiva (megacolon) que se sometieron a resección del segmento afectado por un procedimiento quirúrgico en centros especializados de Cochabamba (Bolivia), utilizando nuevos protocolos de procesado y detección.

En concreto, se utilizaron estrategias para favorecer la solubilidad y la homogeneización de las capas mucosas del tejido intestinal y poder extraer fácilmente el ADN de los mismos. Se utilizó PCR en tiempo real cuantitativa para la detección, amplificación, y caracterización molecular de *T. cruzi*, dirigida al ADN satelital. La identificación de los UDTs de *T. cruzi* fue realizada por PCR basado en la amplificación de los objetivos SL-IRac, SL-IR I y II, 24S α rDNA y A10 mediante PCRs convencionales multilocus que permitieron el análisis directo en las muestras clínicas de las poblaciones parasitarias naturales.

Los resultados encontrados revelaron la presencia de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido colónico, con un predominio de los UDTs TcII y TcV. La UDT TcVI solo se identificó en muestras de sangre.

PALABRAS CLAVE: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, megacolon, UDTs.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades de la Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas (EC), también conocida como tripanosomiasis americana, está causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozoo hemoflagelado perteneciente al orden de los Kinetoplastida (1) . Se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos que actúan como vectores, conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica. Las rutas de transmisión oral y congénita también juegan un papel importante (2).

Aunque la mayor carga sanitaria de la enfermedad de Chagas sigue en América Latina, debido a la movilidad de la población se ha detectado cada vez más en Estados Unidos, Canadá y muchos países europeos(3) .

Se presenta en regiones donde coexiste con otras patologías que son más aparentes y menos silenciosas, razón por la cual frecuentemente pasa desapercibida como problema de salud pública. Esta enfermedad está asociada a las malas condiciones de vivienda de las áreas rurales de todo el continente latinoamericano y a los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades, donde las personas infectadas que migran buscando mejores oportunidades de trabajo no tienen posibilidad de acceder a una atención médica adecuada (3).

La tripanosomiasis americana cumplió en 2009 un siglo desde que Carlos Chagas, quien atiende a una niña en Lassance, Brasil (Fig.1), anunciara el descubrimiento del parásito *T. cruzi*, del insecto vector triatómico y del conjunto de síntomas clínicos característicos de la enfermedad (4).



Figura 1. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879–1934), junto a una paciente.
(Imagen extraída de <https://www.meer.com/es/75684-carlos-chagas>).

Desde 1990, se han puesto en marcha una serie de iniciativas internacionales basadas en el control de vectores, el control sistemático de los donantes de sangre en todos los países endémicos, la detección y el tratamiento de la transmisión congénita para el control y eliminación de la EC. Estas estrategias han conducido a una reducción significativa en el número de personas infectadas en todo el mundo(5). No obstante, la tripanosomiasis americana continúa provocando la mayor carga de morbi-mortalidad de origen parasitario en los países latinoamericanos, a pesar de los importantes avances que se han llevado a cabo en el control de la transmisión vectorial en los últimos años (6) (7). Desde 2009, es una de las infecciones incluidas en la lista de enfermedades olvidadas de la OMS (3)

1.2 Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La epidemiología de la EC ha cambiado como consecuencia de los flujos migratorios de la población de América Latina, tanto a nivel interno de los países afectados con desplazamientos desde las áreas rurales hacia las ciudades, como a nivel externo, hacia países terceros(8) (9). Así, la infección por *T. cruzi* ha pasado de ser una enfermedad relacionada con la pobreza de las áreas rurales latinoamericanas a aparecer progresivamente en ambientes urbanizados de estos países, y también ha emergido en zonas en donde el vector no está presente, convirtiéndose en un problema de salud pública en los países no endémicos, siendo Estados Unidos y España los dos países más afectados (8) (10) (Fig. 2).



Figura 2. Casos estimados de Chagas a nivel mundial. (Imagen extraída de https://el-pais.com/elpais/2015/04/10/planeta_futuro/1428680706_109364.html#)

La EC es endémica en 21 países de las Américas y afecta a un estimado de 6 a 7 millones de personas. Se registran 30.000 nuevos casos cada año, 12.000 muertes anuales de promedio y aproximadamente 9.000 recién nacidos se infectan durante la gestación(3). Actualmente, unos 70 millones de personas en las Américas viven en áreas expuestas al Chagas y están en riesgo de contraer la enfermedad. (3).

El continente más afectado por mayor número de casos reportados según la Fig.2 es América del Sur, siendo los países con más casos, estimados en valores absolutos: Argentina, Brasil y México, seguidos de Bolivia (3). En relación a la vía de transmisión, Bolivia, Argentina y Paraguay (que comparten la región del Gran Chaco) liderarían los países con mayor número de casos adquiridos por transmisión vectorial (3).

En términos de prevalencia relativa a su población, Bolivia es el país con mayor incidencia. La mayoría de las personas infectadas quedan sin diagnóstico, por falta de conocimiento clínico o por falta de medios diagnósticos, quedando consecuentemente sin tratamiento (11).

1.3 Patología y manifestaciones clínicas

Según la última clasificación del Comité Científico de la EC de la Federación Argentina de Cardiología y del Consejo de Miocardiopatías y EC de la Sociedad Interamericana de Cardiología, esta enfermedad se caracteriza por dos fases: aguda y crónica. (Se puede obtener mayor información en los siguientes links a webs institucionales que contienen manuales con las recomendaciones para el diagnóstico y el tratamiento de la EC:

- Organización Panamericana de la Salud:

<https://www.paho.org/es/documentos/guia-para-diagnostico-tratamiento-enfermedad-chagas>.

- Médicos sin fronteras Bolivia: https://www.medicinssansfrontieres.ca/wp-content/uploads/2023/04/manual_de_atencion_integral_de_chagas_en_zona_rural_de_msf_en_bolivia.pdf.

- Ministerio de Salud y Deportes, Programa Nacional de Chagas Bolivia: <https://www.minsalud.gob.bo/component/jdownloads/?task=download.send&id=820:manual-de-normas-tecnicas-y-operativas-para-el-tamizaje-diagnostico-y-tratamiento-de-la-enfermedad-de-chagas-cronica-reciente-infantil&catid=45&Itemid=646>).

1.3.1. Fase aguda

En la fase aguda, que dura de 4 a 8 semanas, la infección por *T. cruzi* es sintomática en un 5-10% de los casos, y en el resto de personas afectadas esta fase pasa desapercibida. Además, la mayoría de signos y síntomas clínicos presentes son inespecíficos, por lo que rara vez se piensa en la EC como causa de enfermedad, excepto en los brotes de transmisión oral, donde hay un mayor número de personas afectadas simultáneamente y con una clínica más frecuente, evidente y grave (12). En contadas ocasiones pueden aparecer lesiones cutáneas que indican el lugar de la inoculación, tales como nódulos cutáneos, conocidos como chagoma de inoculación, o un edema bipalpebral unilateral con conjuntivitis, que se denomina signo de Romaña y es consecuencia de la penetración del parásito por la mucosa ocular. La muerte del paciente en la fase aguda es extremadamente rara y ocurre principalmente por miocarditis o meningoencefalitis, siendo más frecuente en pacientes inmunodeprimidos o en etapas tempranas de la vida (13) (14) (15).

En la fase aguda, predomina el parásito circulante en la corriente sanguínea, lo que facilita su detección directa, y una vez diagnosticada, es el momento ideal para iniciar un tratamiento antiparasitario (3) (7) (13) . Si el parásito no es eliminado durante el episodio agudo, por medio del tratamiento antiparasitario adecuado, se reduce la posibilidad de éxito terapéutico en etapas posteriores y, en la evolución natural de la infección, se considera que la persona va a permanecer infectada por el resto de su vida. En esta fase de infección crónica, la parasitemia se reduce hasta convertirse en intermitente y difícil de detectar (15).

1.3.2 Fase crónica

Comienza cuando el sistema inmune controla la reproducción del parásito y la parasitemia se vuelve indetectable por los métodos parasitológicos directos convencionales. En esta fase, la infección es detectable principalmente por métodos serológicos, que demuestran la respuesta inmunológica del hospedador frente al parásito. Durante la fase crónica, los parásitos se ocultan en los tejidos diana, especialmente en los sistemas cardíaco y digestivo (7). La mayoría de los pacientes crónicamente infectados no presentan síntomas por el resto de sus vidas (etapa crónica, fase indeterminada) (16). Las escasas lesiones histopatológicas de la etapa crónica, sin patología demostrada de la enfermedad, se caracterizan por la presencia de focos inflamatorios puntuales y aislados, lisis y degeneración de células del músculo esquelético (17).

Sin embargo, aproximadamente 20-35 % de los pacientes crónicamente infectados desarrollarán síntomas cardíacos que pueden llevar a la muerte súbita, como arritmias cardíacas o fallo cardíaco; y en un 10-20% de pacientes se detectan daños digestivos que provocan lesiones localizadas, así como megalias del esófago y el colon (megaesófago y megacolon, respectivamente). El compromiso del sistema nervioso periférico ocurre en menor proporción, en menos del 5% de afectados (3) (15) (18).

1.3.2.1 Forma cardíaca

Se han descrito cuatro mecanismos que contribuyen a la patogénesis de la forma crónica cardíaca: (i) inflamación dependiente de la presencia del parásito; (ii) lesiones inmunomediadas; (iii) trastornos neurogénicos; y (iv) trastornos microvasculares; siendo la presencia persistente del parásito en los tejidos crucial para el inicio de los eventos fisiopatológicos (15).

La progresión de la enfermedad cardíaca en el Chagas crónico es de baja intensidad y las lesiones y la miocarditis avanzan lentamente, pero de forma progresiva y constante hasta deparar el deterioro de la función contráctil y las otras complicaciones (dilataciones de las cámaras cardíacas, arritmias) (15).

1.3.2.2 Forma digestiva

En la forma crónica digestiva, también es crucial la persistente presencia del parásito que, a su vez decanta, posiblemente a través de una reacción inflamatoria, mecanismos fisiopatológicos que deparan las lesiones a largo plazo. Como ocurre a nivel cardíaco, el desarrollo de las lesiones es lento y persistente en el tiempo.

Los síndromes chagásicos digestivos provocan megavísceras siendo las más frecuentes las que afectan al esófago y al colon. La degeneración y la reducción en el número de neuronas de los plexos mientéricos del esófago y colon son considerados elementos fundamentales de la patogenia de la enfermedad a nivel digestivo que provoca los megasíndromes (19) (20). Al alterarse la motilidad del esófago se produce disfagia, dolor epigástrico o retroesternal y regurgitaciones. Los pacientes, además de los problemas intrínsecos a nivel del aparato digestivo, pueden sufrir desnutrición o neumonitis por aspiración repetitiva (21). El pronóstico de la forma digestiva es generalmente bueno, a excepción de las complicaciones que pudieran aparecer como cáncer esofágico, obstrucción por torsión y necrosis en el colon (5).

1.3.2.3 Daño tisular relacionado directamente con la presencia del parásito

A pesar de que aún no se conocen completamente los mecanismos moleculares que determinan cómo se regula la interacción entre el parásito y el hospedador en relación a la invasión celular y a la localización de los parásitos en los tejidos, se ha sugerido que las variaciones en el tropismo tisular encontradas, que dependen de las propiedades genéticas tanto del parásito como del hospedador, pueden explicar las diferentes formas clínicas de la enfermedad (22). Desde los primeros estudios histopatológicos, el daño tisular del corazón y del tracto gastrointestinal que tiene lugar en la etapa aguda ha sido claramente relacionado con la intensa parasitemia y el parasitismo de los órganos diana (23). Así, los estudios posteriores con técnicas histológicas más sensibles (inmunohistoquímica, PCR e hibridación *in situ*), permitieron identificar antígenos de *T. cruzi* o su material genético en los focos inflamatorios (24) (25).

Estos estudios destacaron nuevamente el rol patogénico de la persistencia del parásito en los tejidos del hospedador. Los modelos experimentales de tratamiento también sugieren que la persistencia del parásito está directamente implicada en la patología de la etapa crónica, ya que una reducción en la carga parasitaria, mediada por los fármacos tripanocidas, lleva a una atenuación en los síntomas de la miocardiopatía chagásica (26) (27) (28).

1.4. Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

1.4.1 Morfología y formas evolutivas

El agente etiológico de esta enfermedad es *T. cruzi*, un parásito intracelular hemoflagelado del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae. Los integrantes de esta familia se caracterizan por la presencia de un flagelo y una única y ramificada mitocondria, que se extiende por todo el cuerpo celular (29). Dicha mitocondria tiene así mismo una doble membrana directamente relacionada con el kinetoplasto, una estructura circular que contiene el ADN mitocondrial (ADN-k). Este material genético extranuclear se organiza en estructuras atípicas llamadas maxicírculos (20-40 kb) y minicírculos (0,5-2,5 kb), que representan entre 15-30% del genoma celular (30).

El único flagelo está compuesto por nueve pares de microtúbulos (distribuidos en forma de círculo) y dos microtúbulos centrales dentro de una matriz citoplasmática rodeada por una membrana este desaparece cuando viven como parásito intracelular (31).

El parásito presenta tres estadios morfológicos durante su ciclo de vida: amastigote, epimastigote y tripomastigote, que se identifican por la posición del cinetoplasto en relación con el núcleo (Fig. 3) (30). Las formas extracelulares, tripomastigote y epimastigote, poseen una membrana ondulante larga o corta, respectivamente, muy característica, que recorre el citoplasma y se continúa en un único flagelo libre en la región anterior. La forma del citoplasma, la longitud de la membrana ondulante y la disposición del kinetoplasto permiten la diferencia morfológica entre estas dos formas evolutivas (30).

a) Amastigote: es la forma intracelular del parásito que se localiza en los tejidos del hospedador vertebrado. Forma replicativa intracelular en los mamíferos, se multiplica por fisión binaria longitudinal. Está desprovisto de flagelo libre y de membrana ondulante, es redondeado, y mide de 2 a 6.5 μm de diámetro (30).

- b) Epimastigote:** es una forma que se encuentra en el tracto digestivo del insecto vector. Tiene capacidad replicativa en el intestino del triatomino donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectantes (32). El flagelo emerge de la parte media del parásito y forma una membrana undulate más pequeña que la observada en los tripomastigotes (30).
- c) Tripomastigote:** es la forma extracelular en los mamíferos. Mide de 16-20 μm y se encuentra circulante en sangre periférica y en el intestino terminal del redúvido (tripomastigote metacíclico). No tiene capacidad replicativa, pero propaga la infección a otras localizaciones dentro del organismo y a otros mamíferos a partir de las heces del vector (30).

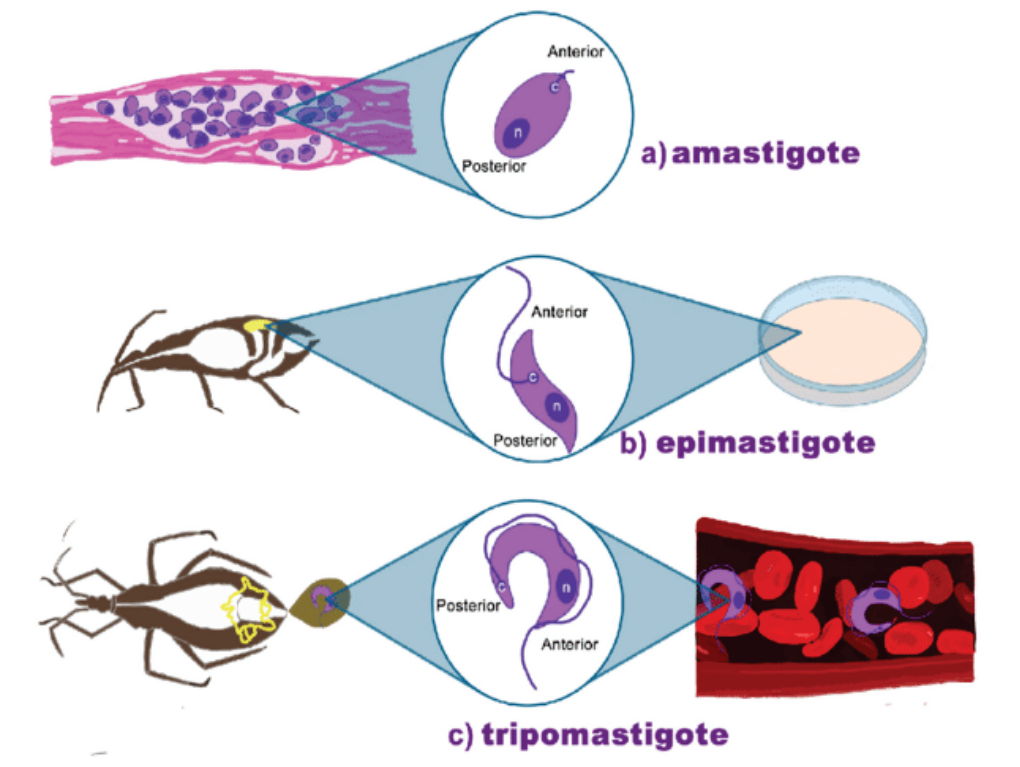


Figura 3. Localización y morfología de *T. cruzi* en sus estadios.

(Imagen extraída de “Peña *et al.*, 2022”).

1.4.2 Ciclo biológico

T. cruzi es un organismo pleomórfico con tres fases alternas en su ciclo, entre un hospedador invertebrado, los triatominos hematófagos obligados, y un hospedador vertebrado, como el ser humano entre otros (Fig. 4).

Los triatomíneos se infectan con tripomastigotes de *T. cruzi*, que circulan en el torrente sanguíneo del hospedador vertebrado, mediante la ingestión, por la picadura, de sangre de un hospedador humano o animal infectado. En el vector se transforman en epimastigotes en la porción media del tubo digestivo, donde se multiplican por fisión binaria y migran a la porción final del tubo digestivo, donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos (forma infectante).

Los tripomastigotes son depositados junto con la materia fecal sobre la piel del nuevo hospedador cerca del lugar de la picadura, durante o después de la alimentación del vector. Las heces del triatomíneo poseen un material irritante que causa prurito provocando el acto de rascado y la auto-inoculación de los parásitos presentes en las heces en contacto con las mucosas, escoriaciones cutáneas o la herida provocada por la picadura.

Al ingresar en el organismo, los tripomastigotes son fagocitados por macrófagos y se transforman en amastigotes, que se dividen por fisión binaria, hasta que acabado su ciclo se transforman en nuevos tripomastigotes, los cuáles rompen la célula, y a través de la circulación sanguínea y linfática, penetran en nuevas células y tejidos, donde inician nuevos ciclos de tripomastigote-amastigote-tripomastigote. El ciclo se completa cuando un triatomíneo se alimenta de sangre de un hospedador infectado adquiriendo tripomastigotes circulantes de un individuo con parasitemia que se transformarán en su intestino en epimastigotes que darán lugar de nuevo a tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior (33).

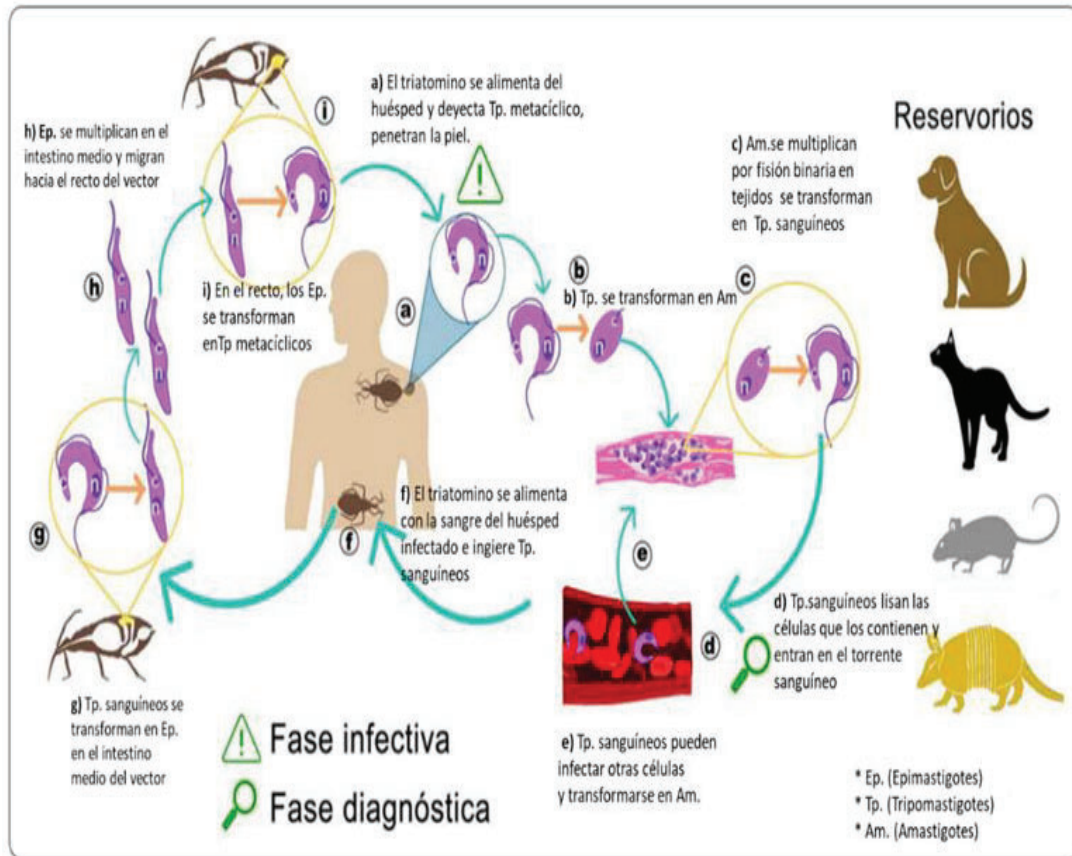


Figura 4. Representación del ciclo biológico de *T. cruzi* y reservorios. (Imagen modificada de Peña et al., 2022).

1.5. Vías de transmisión

La EC es una zoonosis en la que actúan como reservorio diversos mamíferos, tanto domésticos (perros, gatos, cobayas, entre otros), como selváticos (roedores, marsupiales, armadillos, etc.), todos ellos implicados, junto al ser humano y al vector, en tres potenciales ciclos epidemiológicos de transmisión del parásito: doméstico, peri-doméstico y selvático (15).

Además de la transmisión vectorial, se han descrito otras vías de transmisión de *T. cruzi* al ser humano: la vía oral (a través de bebidas y alimentos contaminados con el parásito), la transmisión congénita (durante el embarazo o parto), transfusional (a través de la sangre o de productos sanguíneos), por trasplante de órganos y por accidentes de laboratorio, permitiendo así la enfermedad en zonas no endémicas a la presencia de los vectores (9).

1.5.1 Transmisión vectorial

La vía de transmisión vectorial ha sido históricamente la más frecuente en área endémica, a partir de triatominos. Se trata de insectos hematófagos de la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, de las que existen más de 140 especies capaces de transmitir la infección. Las más frecuentes pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* y son: *T. infestans* (Fig. 5), *T. dimidiata*, *R. prolixus*, y *P. megistus*, principalmente. Además, otras especies transmisoras frecuentes son *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida*, *T. maculata*, *P. geniculatus*, *R. ecuadoriensis* y *R. pallescens* (34).



Figura 5. Vinchuca adulta (*Triatoma infestans*), vector de transmisión de *T. cruzi*. (Imagen extraída de Médicos sin fronteras, 2016).

Los vectores, tradicionalmente rurales y selváticos, también se han adaptado a las nuevas circunstancias, y han emergido nuevas modalidades de ciclos en zonas periurbanas en varios países (35) (36) (37). El principal vector de transmisión (*Triatoma infestans*) está presente en aproximadamente el 60% del territorio boliviano, donde el sistema de vigilancia entomológica comunitaria, busca dar protagonismo a la familia en la detección del vector, la limpieza de las viviendas, así como en su participación directa en realización de mejoras de sus viviendas.



Figura 6. Zona peri domiciliar de viviendas de zona rural OTB Esquilan Agraria Colca-pirhua Cochabamba Bolivia. Imagen Propia Cochabamba Bolivia 2022.

Estos vectores están presentes en la zona peri domiciliar, se alimentan de sangre de animales o seres humanos, defecan liberando los tripomastigotes metacíclicos presentes en su intestino, cerrando el ciclo biológico de *T. cruzi* (33). En Bolivia existen familias que se dedican a crianza de animales en corrales, que están en lugares cercanos a las viviendas, como muestra la imagen de la Fig. 6, representando focos de atracción y multiplicación de las vinchucas.

A pesar de la existencia de programas de control vectorial y de su éxito inicial, hay zonas de varios países en los que, por falta de mantenimiento de estos programas, ha emergido de nuevo la transmisión vectorial. La pandemia de COVID-19 ha agravado la situación en amplias áreas de países del cono sur de América Latina (38). Por ello, la estrategia de control vectorial con participación comunitaria ha emergido como una estrategia más sostenible (39)(40) .

1.5.2. Transmisión congénita

Después de que los programas de control vectorial fueran llevados a cabo en distintas fases temporales de las últimas tres décadas, la transmisión vectorial se ha conseguido reducir de forma significativa en muchas áreas endémicas. Por ello, la transmisión vertical madre-hijo se ha convertido actualmente en una vía importante de transmisión de la infección en estas áreas endémicas (41) (Fig. 7). Distintos estudios epidemiológicos estiman la tasa de transmisión vertical en zona endémica entre el 1-10%, según áreas geográficas (42) (43) (44). En Bolivia, un estudio reciente en el área del Chaco Tarijeño ha detectado una tasa de transmisión del 10,3% (45).



Figura 7. Transmisión vertical o congénita. Imagen extraída “OPS 2023”:

<https://who.canto.global/v/UM8U4JCMQL/album/SURCN?auth=sso&viewIndex=0>

El proceso de transmisión no se conoce completamente y en él se implican distintos factores: i) placentarios y maternos: como la inmunosupresión relativa durante la gestación; ii) fetales: como la capacidad inmunológica del feto a hacer frente a la infección, y iii) otros factores intrínsecos del parásito como la parasitemia o la UDT que condiciona su histotropismo por la placenta (46) (47).

De todos ellos, la parasitemia detectada en el tercer trimestre de la gestación es el factor de riesgo que más se ha asociado con la posibilidad de transmisión de la infección al feto (48) (49) (50). Esta asociación es tan robusta, que se ha llegado a proponer realizar el diagnóstico postnatal únicamente en los recién nacidos de madres que presenten parasitemia detectable mediante técnicas de alta sensibilidad como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que sólo estos presentarían riesgo de infección (50).

1.5.3 Transmisión por vía transfusional de hemoderivados

La transmisión de la infección se puede producir a partir de distintos tipos de hemoderivados provenientes de donantes con tripomastigotes circulantes. Se han descrito casos de transmisión a partir de sangre completa, concentrados de hematíes y plaquetas e incluso de colonias de granulocitos, pero no de plasma (51).

Otros factores de riesgo para la transmisión son el volumen de sangre transfundido, la UDT del parásito que determina su histotropismo, la carga parasitaria del donante, y el estado inmunitario del receptor (52).

1.5.4. Transmisión por trasplante de órganos

La infección por *T. cruzi* se puede transmitir de un donante de órganos seropositivo para Chagas a un receptor seronegativo (53). Portar la infección es contraindicación absoluta para el trasplante cuando el donante se encuentra en fase aguda (53).

El riesgo de transmisión depende del órgano trasplantado, siendo de mayor riesgo en el caso del corazón (75%), seguido del pulmón (66,6%), el hígado (29%) o el riñón (18-19%) (54). La segunda problemática en relación a los trasplantes de órganos es por el riesgo de recrudescencia en aquellos pacientes portadores de *T. cruzi* y que reciben tratamiento inmunosupresor debido al trasplante recibido. En estos casos, se puede optar por un tratamiento antiparasitario previo para minimizar o eliminar el riesgo. En cualquier caso, se haga o no este tratamiento previo, se requiere una estrecha monitorización post-trasplante para poder detectar la posible recrudescencia y tratarla adecuadamente antes de que sobrevengan complicaciones (40).

1.5.5 Transmisión oral

La transmisión oral se produce a partir de alimentos o bebidas contaminados con heces de triatomíneos donde están presentes los tripomastigotes metacíclicos (55). Es un tipo especial de transmisión vectorial que se da en las zonas endémicas de América Latina (56). Se ha demostrado experimentalmente que la persistencia de tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi*, pueden persistir entre 10-24 h en los alimentos, incluyendo helados guardados a -20°C, dependiendo de las características de éstos (57) (58).

Los cambios ambientales posiblemente han influido en un aumento de brotes de transmisión oral; entre éstos, la deforestación en áreas periurbanas y la eliminación de fauna silvestre han propiciado que vectores silvestres se hayan adaptado a las viviendas de los seres humanos (59). En las últimas décadas, ha habido un aumento en la detección de brotes orales en el cono sur de América Latina (12) (31) (60) (61).

1.6. Diagnóstico

Las técnicas diagnósticas incluyen métodos parasitológicos, serológicos y moleculares. La utilización de cada método depende del estadio de la enfermedad (agudo o crónico), ya que en la fase aguda existe una parasitemia elevada y ésta es baja e intermitente en la fase crónica.

Generalmente, las técnicas parasitológicas y moleculares se utilizan en la fase aguda y las técnicas serológicas en la fase crónica (62) (63) (64). En el diagnóstico por serología, la OPS/OMS recomienda para el diagnóstico de la infección crónica el uso de dos pruebas que utilicen diferentes tipos de antígenos que deben concordar para confirmar el diagnóstico. Una tercera prueba sería usada para el desempate en caso de discordancia entre las dos anteriores. Los métodos más utilizados por su rendimiento, practicidad y disponibilidad son los ensayos inmunoenzimáticos de tipo ELISA (11).

1.6.1 Métodos parasitológicos

1.6.1.1 Métodos parasitológicos directos

Se utilizan fundamentalmente para la detección de la fase aguda de la enfermedad, y consisten en la observación al microscopio de la sangre del paciente para detectar la presencia de los parásitos (tripomastigotes circulantes) (Fig. 8). Estos métodos incluyen:

- **Examen en fresco** (Fig. 8 A1): se coloca una gota de sangre fresca entre dos láminas de vidrio (porta- y cubreobjetos) y se visualiza al microscopio a 40x aumentos del lente objetivo. Se pueden detectar los parásitos por su movimiento ondulante característico, reconociéndolos entre los glóbulos rojos y facilitándose la observación con el microscopio de contraste de fases (65).

- **Frotis o extensión**: consiste en colocar una pequeña porción de sangre sobre un portaobjetos (completamente desengrasado), próxima a una de sus extremidades. Se apoya otro portaobjetos sobre la primera, en un ángulo de 45°, y se extiende la gota a lo largo de la lámina (Fig. 8 A1). La observación directa se realiza al microscopio. Dicha observación puede ser realizada coloreada o teñida por el método de Giemsa, lo que permite determinar la morfología del parásito (3).

- Concentración de **gota gruesa** (Fig. 8 A2): se colocan dos o tres gotas de sangre sobre un portaobjetos, reuniéndolas para confeccionar una única mancha circular de 1 cm de diámetro. Después de dejar secar la sangre a temperatura ambiente, se procede a hemolizar con agua tamponada a pH 7,2 y, una vez seca, a teñir con el colorante de Giemsa para una mejor observación de los parásitos al microscopio con un aumento de 100x del lente objetivo (66) (65).

Cuando no se observan los tripomastigotes al microscopio con las anteriores técnicas y persiste la sospecha clínica, se puede aplicar otro método de concentración para aumentar la sensibilidad, como es el **método Strout** (67) (Fig. 8 A3). Para ello, se toman 5 ml de sangre en un tubo sin anticoagulante, se deja en reposo a temperatura ambiente, para que la coagulación y retracción espontánea del coágulo ocurra. Se centrifuga el suero obtenido, para la separación de los eritrocitos aún en suspensión y, enseguida, se hace una nueva centrifugación, para obtención del sedimento que será observado en el microscopio.

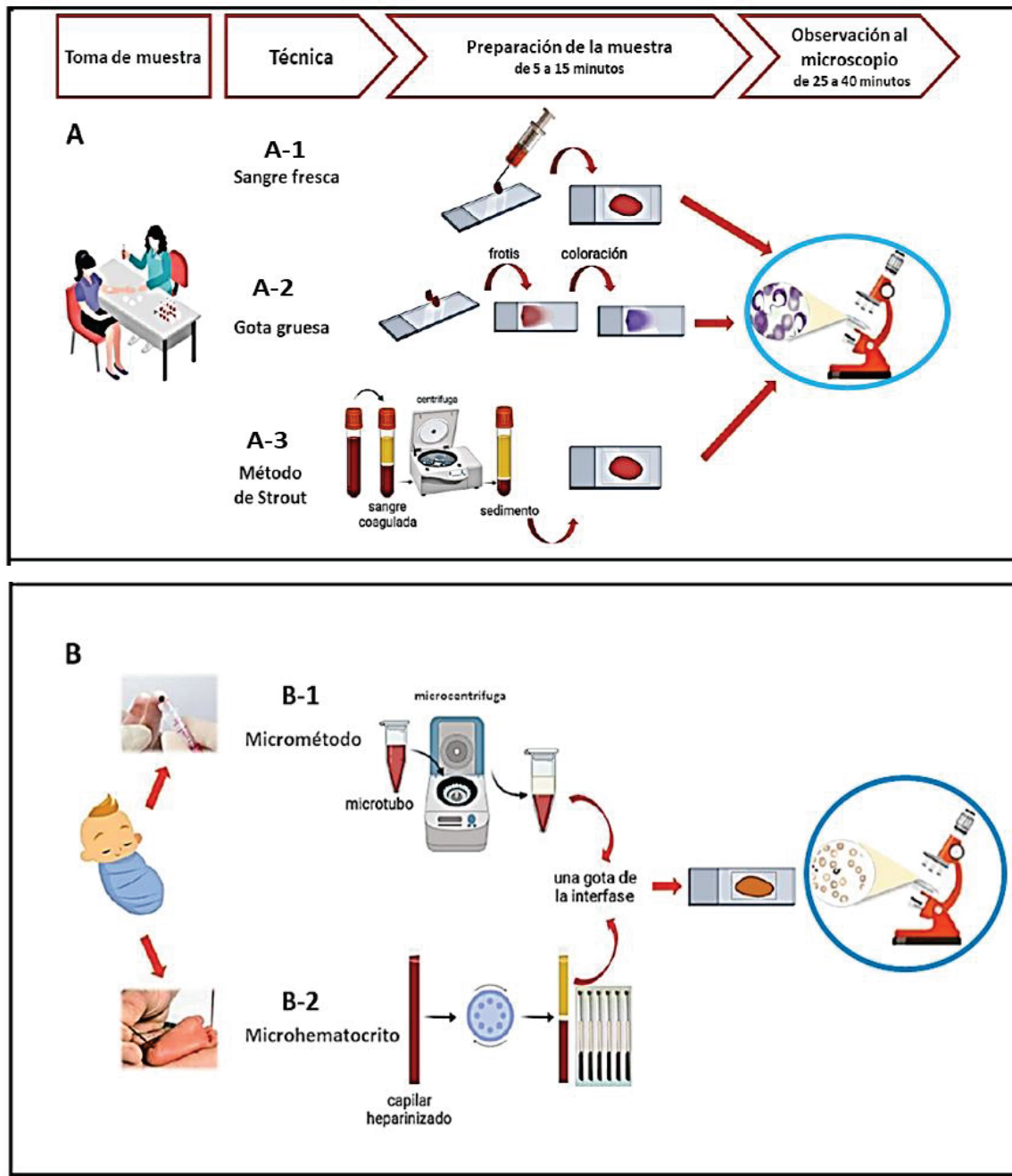


Figura 8. Diagrama de métodos parasitológicos directos para el diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi*. (Imagen extraída de Longhi & Schijman 2022).

En recién nacidos o neonatos, dado que se dispone de un volumen de sangre muy bajo, se deben utilizar otros métodos (Fig. 8 B). Es el caso del **microhematocrito**, llenando hasta 4 - 6 capilares heparinizados con sangre entera (Fig. 8 B2), o el **micrométodo** en el que la sangre entera se transfiere a un tubo de 1,5 ml, se centrifuga, y después de centrifugar, se observa la interfaz entre los glóbulos rojos y el plasma en un microscopio (Fig. 8 B1)(67) (68).

Estos métodos se utilizan principalmente al nacimiento, y en los primeros meses de los recién nacidos de madres seropositivas, cuando la parasitemia y la probabilidad de detección del parásito son altas. Estas técnicas de diagnóstico se deben realizar en el mismo día que se extrae la sangre, ya que a medida que transcurre el tiempo se pierde sensibilidad porque los parásitos dejan de moverse de la forma ondulante característica que facilita su detección (65) (66).

1.6.1.2 Métodos Parasitológicos Indirectos

Estos métodos se basan en la inoculación y proliferación de parásitos en animales o en sistemas de cultivo *in vitro*. El **xenodiagnóstico** fue el primer procedimiento utilizado cuando se describía la enfermedad (Fig. 9A). Consiste en alimentar a los triatominos, mantenidos en cultivo en el laboratorio, con la sangre de los pacientes en sospecha y, luego de 30 a 60 días de haberlos alimentado, se examinan sus heces (excrementos) para detectar la presencia de parásitos (epimastigotes).

También se ha utilizado el **hemocultivo** (Fig. 9B), que se basa en la recolección de sangre del caso sospechoso y su siembra en medio de cultivo LIT suplementado estéril para favorecer la evolución y multiplicación de los tripomastigotes. La observación del cultivo debe realizarse mensualmente durante seis meses para llegar a un diagnóstico (64) (68) (69).

La inoculación de ratones con sangre de pacientes o con heces de insectos, después de realizado el xenodiagnóstico, es otro procedimiento factible pero rara vez empleado en la actualidad. En este caso, la sangre de la cola de los ratones inoculados debe examinarse diariamente durante uno a dos meses (70) (Fig. 9C).

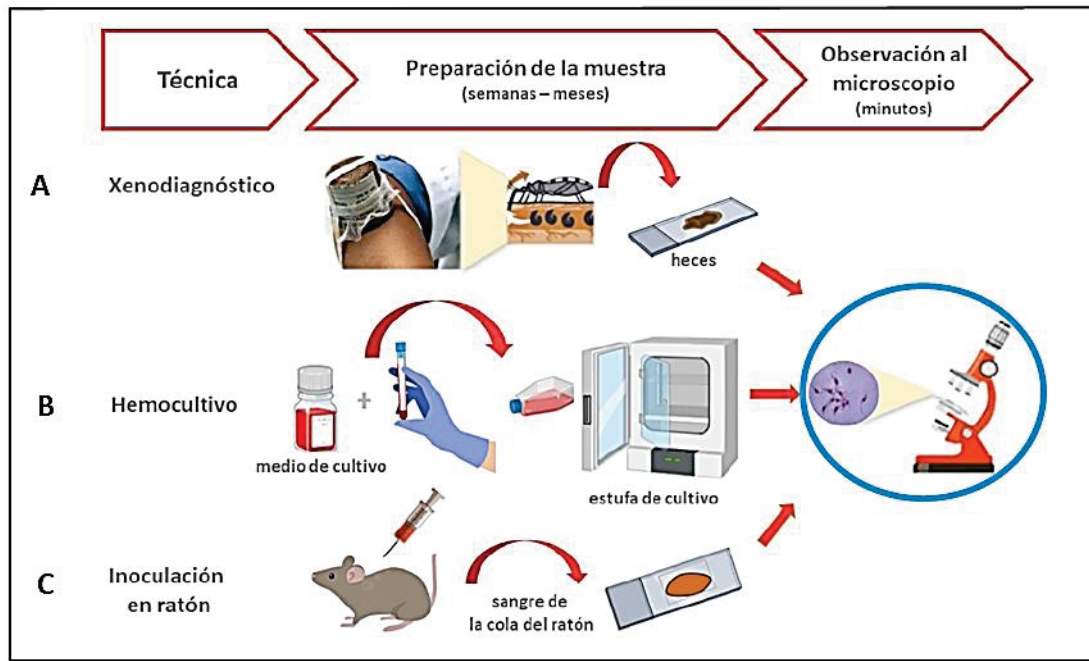


Figura 9. Diagrama de métodos parasitológicos indirectos para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Imagen extraída Longhi & Schijman 2022.

1.6.1.3 Métodos moleculares

Las técnicas de biología molecular que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han mejorado el diagnóstico de los casos de infección aguda. Además, ofrecen una herramienta para el seguimiento de los pacientes en fase crónica y han abierto nuevas alternativas al diagnóstico directo de la infección (71) (72)(73). Son métodos que presentan alta sensibilidad en la fase aguda, mientras que en la fase crónica su sensibilidad disminuye debido a las bajas parasitemias.

Las técnicas de biología molecular requieren la extracción del ADN de una muestra de sangre o de tejido y de un sistema de detección del producto de la reacción, que puede ser por diferentes métodos. Las formas de extracción de ADN más usadas son los métodos de extracción por columna y por partículas magnéticas; éstas últimas pueden ser utilizadas con un equipo automatizado. En todo caso, los reactivos para las pruebas de amplificación molecular son más caros que los de pruebas microscópicas. En áreas sin capacidad preexistente, las muestras deben enviarse a laboratorios de mayor complejidad o de referencia.

En cuanto a la forma de detección del resultado, en la **PCR convencional**, se realiza por medio de una electroforesis en geles de agarosa en la que los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda de revelado" en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento cuando se une o intercale al ADN (Fig. 10A). Estos primeros ensayos se utilizaron principalmente en estudios de investigación. Sin embargo, su uso se extendió posteriormente al diagnóstico clínico (74) (75).

La **PCR en tiempo real** o **PCR cuantitativa (qPCR)** es una modalidad de la PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir "en tiempo real" (76) (77) (Figura 10B). Sin embargo, requiere de un equipamiento más costoso y de personal capacitado, que no siempre está disponible en los centros de salud u hospitales en los países endémicos, como Bolivia. Los resultados se obtienen mediante el procesamiento de datos que realiza el propio programa del equipo y requieren rutinas de laboratorio y programas de control de calidad internos y externos (78) (79) (80).

La **Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)** y la **proteína de replicación A (RPA)** son técnicas más modernas donde la reacción de amplificación ocurre a una única temperatura, por lo que no requieren de un termociclador sino solo de un bloque térmico o baño de agua (Fig. 10C y 10D). (81) (82). La técnica LAMP tiene las características de ser simple, rápida, específica, sensible y de bajo costo; todo ello la faculta para ser una excelente alternativa como una prueba a desarrollarse en regiones endémicas y con requerimientos básicos de infraestructura, como es el caso de laboratorios donde no se cuenta con el equipamiento ni personal capacitado (83) (84). Actualmente, se está evaluando en regiones endémicas, mostrando un rendimiento notable en términos de sensibilidad y estabilidad (85).

En Bolivia, a partir de 2004, el Programa Nacional de Chagas y las seis regionales endémicas, han implementado la estrategia de diagnóstico y tratamiento de Chagas principalmente Chagas congénito mediante identificación de madres infectadas por pruebas serológicas en control prenatal, la búsqueda del *T. cruzi* en la sangre del cordón o del recién nacido mediante técnicas parasitológicas y el análisis serológico a partir de los 6 meses hasta el año de edad. El ensayo de amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) es fácil de usar y podría ser una solución tecnológica a los inconvenientes derivados de un algoritmo con multitud de pruebas en las que las primeras, basadas en microscopía, resultan subóptimas (85).

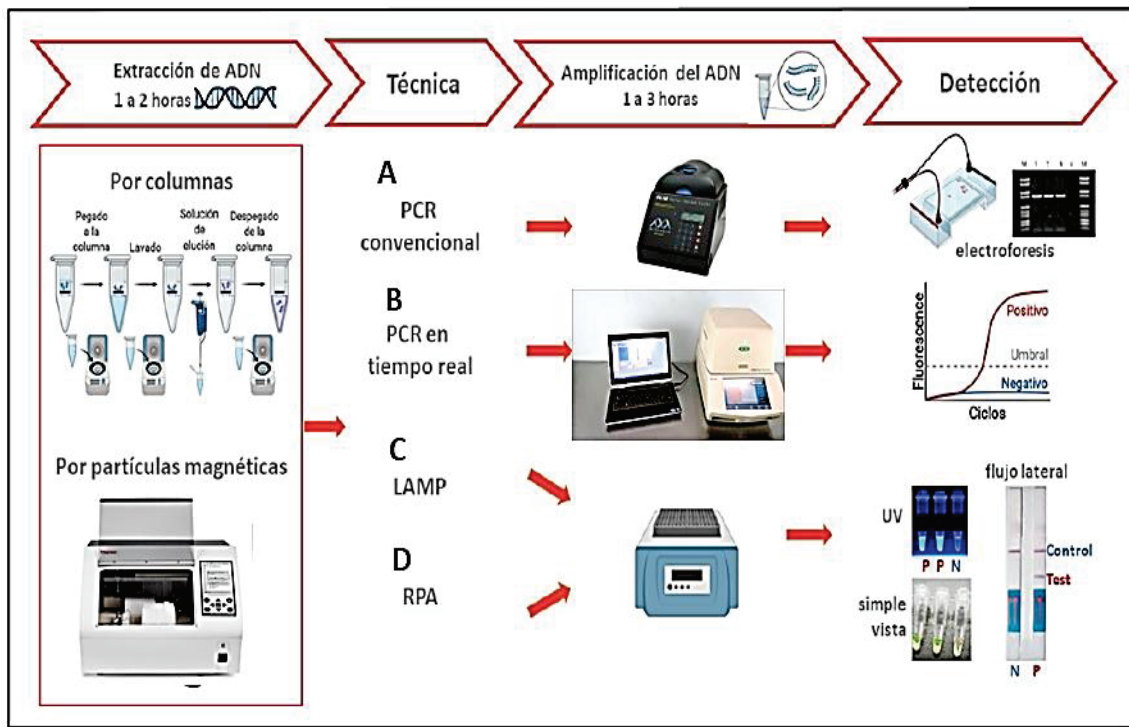


Figura 10. Diagrama de métodos moleculares para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Imagen extraída de “Longhi & Schijman 2022”.

La detección del ADN del parásito, mediante técnicas de biología molecular, en sangre periférica de pacientes con EC en fase crónica resulta positiva en aproximadamente el 40-70% de los pacientes dependiendo de los estudios analizados (33). La variabilidad se podría explicar por la forma de procesar la muestra, el volumen a testar, por la diana elegida para amplificar, por las características diferenciales de los pacientes y por las diferentes cepas infectantes (86) (87).

La qPCR es una herramienta cada vez más utilizada en los laboratorios y ya se han desarrollado numerosas estrategias (74) (77) (88) (89) (90), permitiendo detectar la generación exponencial del ADN de doble cadena, o bien sondas dependientes de secuencia marcadas con fluorocromo (por ejemplo sondas TaqMan), mucho más específicas que permiten determinar uno o más productos de amplificación con una determinada longitud de onda y un detector de la señal de fluorescencia (80) (91), al mismo tiempo que permiten determinar la cantidad de parásito (carga parasitaria) presente en la muestra biológica mediante una curva patrón obtenida con concentraciones conocidas de *T. cruzi*. Las dianas moleculares más utilizadas en el diagnóstico de la infección, y que se recomiendan para detectar *T. cruzi* en muestras clínicas,

son la secuencia nuclear repetida del ADNsat (71) (77), así como también el minicírculo del ADNk, tanto las zonas conservadas como las variables (72) (92), presentes en múltiples copias. Ambas dianas se encuentran representadas en gran número de copias por genoma y tienen una sensibilidad que puede ser inferior al ADN equivalente a un parásito (93) (94). Estas dianas han sido probadas y aceptadas en diferentes estudios internacionales y multicéntricos (75) (95).

El ADNsat es una secuencia conservada de 195 pares de bases (pb) organizada en serie y que presenta entre 20.000 y 120.000 copias por genoma, dependiendo de la cepa (96)(97) (Fig. 11).

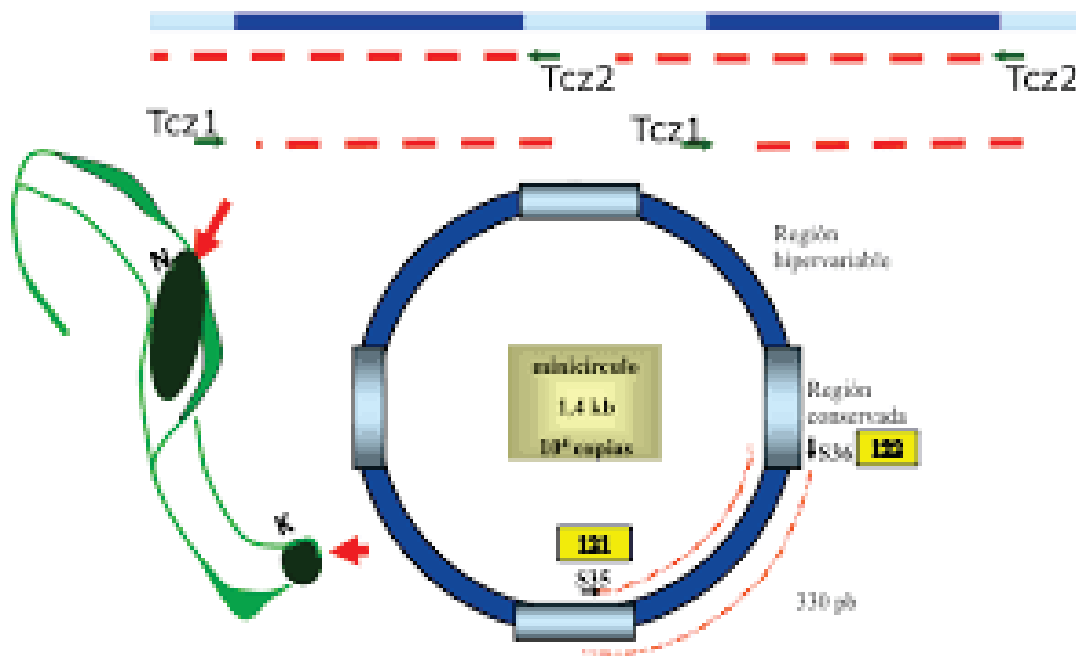


Figura 11. Esquema de las repeticiones en tándem del ADNsat. Imagen del minicírculo extraída de Schijman., 2015 y esquema del minicírculo extraído y modificado de Ryan y col.,1988).

1.6.1.4 Métodos inmunológicos

La mayoría de los ensayos empleados durante los últimos 40 años para el diagnóstico de la infección crónica se basan en pruebas serológicas. En América Latina, las más empleadas son técnicas convencionales como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la inhibición de la hemoaglutinación (HAI) o el inmunoensayo enzimático (ELISA). Esta última técnica alcanza los valores más óptimos de sensibilidad y especificidad y es la más frecuentemente usada (98).

Puesto que ninguna de las pruebas alcanza simultáneamente un 100% de sensibilidad y especificidad, la OMS/OPS define el diagnóstico de la infección en su fase crónica mediante la positividad de dos pruebas basadas en antígenos diferentes (7). En caso de discordancia, se debe realizar una tercera prueba para confirmar o descartar la infección. Estas discordancias, además de la baja sensibilidad de algunas pruebas en algunas regiones, pueden deberse a reacciones cruzadas, principalmente con otros protozoos hemoflagelados, como *Leishmania* spp. o *Trypanosoma rangeli* (99).

La técnica de **HAI** (Fig. 12A) es el ensayo más simple y menos costoso. El procedimiento tiene pocos pasos, lo que reduce los errores de manipulación. Se ponen en contacto glóbulos rojos sensibilizados de una especie animal (generalmente ovino) y suero del paciente durante una o dos horas. Después de este tiempo, si los anticuerpos específicos del parásito están presentes en el suero, los glóbulos rojos forman una red en el fondo del tubo o pozo, que se lee a simple vista (65).

La **IFI** requiere antígeno entero formulado sensibilizado en portaobjetos y observar el resultado con microscopio de fluorescencia. La interpretación de los resultados depende del operador, por lo que es una técnica subjetiva (Fig. 12B). Su principal ventaja es su alta sensibilidad (>99%), pero la especificidad no es tan buena (>96 %), especialmente debido a la reactividad cruzada con otros patógenos (65).

El **ELISA** (Fig.12C) incluye la incubación del suero de los pacientes con antígenos del parásito adheridos a los pocillos de una placa de microtitulación. Puede utilizarse como antígeno tanto el parásito completo o extractos purificados, como antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (65).

Las estrategias de ingeniería genética han logrado la construcción de antígenos recombinantes adecuados a diferentes formatos de ensayos inmunológicos, tales como la mezcla de antígenos recombinantes (100), péptidos cortos (101) o matrices antigénicas basadas en proteínas quiméricas compuestas por fragmentos de aminoácidos inmunodominantes repetitivos y conservados de varias proteínas de *T. cruzi* (102). Dichos antígenos recombinantes se han utilizado en pruebas ELISA de última generación. Alternativamente, los ensayos inmunológicos recombinantes pueden utilizar formatos de detección de alta sensibilidad, siendo la quimioluminiscencia la más empleada (65). Estas técnicas de quimioluminiscencia han sido mencionadas como técnica única a utilizar en el algoritmo para el cribado en bancos de sangre y para el diagnóstico de rutina en laboratorios clínicos, debido a su elevada sensibilidad, al menos en zona no endémica con recursos, puesto que su uso es costoso (88) (103).

Hay varias técnicas de diagnóstico rápido (TDR) disponibles comercialmente para el diagnóstico de la infección (87) (Fig. 12D). Éstas se desarrollaron para ser utilizadas como diagnósticos en puntos de atención en el contexto de entornos altamente endémicos y que carezcan de los recursos en laboratorio (47). Diversos estudios han mostrado que pueden proporcionar muy buena sensibilidad y especificidad, incluso trabajando con pequeños volúmenes de sangre entera(104). Además, el uso combinado de dos TDR ya se ha sugerido como sustituto del algoritmo actual basado en métodos serológicos convencionales (105).

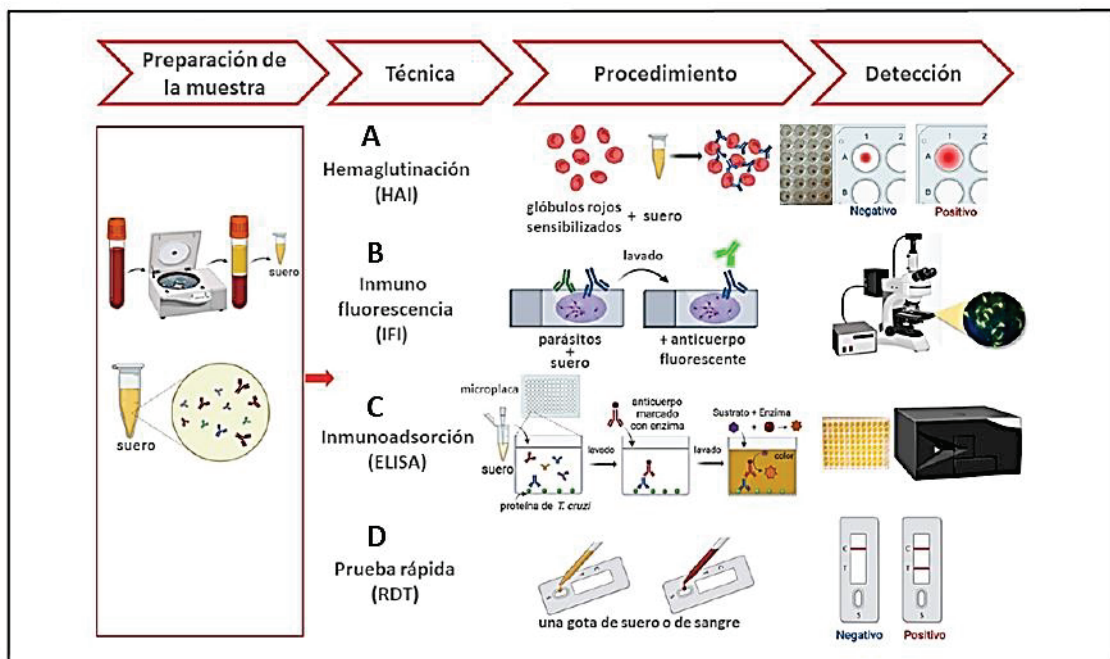


Figura 12. Diagrama de métodos serológicos para el diagnóstico de la infección crónica por *T. cruzi*. Imagen extraída “Longhi & Schijman 2022”.

1.7. Tratamiento

Para el tratamiento de la EC tenemos el benznidazol (que actúa dañando el DNA mitocondrial del parásito) y el nifurtimox (que induce al estrés oxidante, inhibiendo el crecimiento de los parásitos). Estos dos son los únicos fármacos con eficacia probada en su actividad anti-parasitaria (15). Sin embargo, dicha eficacia se ve reducida durante la etapa crónica de la infección (106). Idealmente, el tratamiento debe administrarse por 60 días, pero en algunos casos se producen reacciones adversas, que pueden llegar a ser frecuentes y llegan a provocar la discontinuidad del mismo en algunos pacientes (106). En Bolivia estos medicamentos no están disponibles en el comercio y su distribución es controlada por el Ministerio de Salud de Bolivia.

Si bien los fármacos resultan eficaces en el tratamiento de la fase aguda y la infección temprana en los niños, los fracasos terapéuticos son comunes en la fase crónica en la que se diagnostica la mayoría de los pacientes (107)

Los resultados de diversos ensayos clínicos recientes muestran que las parasitemias detectadas en pacientes crónicos antes del tratamiento con benznidazol mediante técnicas moleculares (PCR) se negativizan después del tratamiento en un 80% de casos. (40) (108).

1.8. *Trypanosoma cruzi* y diversidad genética

1.8.1 Unidades Discretas de Tipificación (UDT) de *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un microorganismo complejo desde el punto de vista genético y antigénico. Su forma de propagación es clonal, pero simultáneamente es capaz de realizar procesos de intercambio genético y de recombinación que dan lugar a una población muy heterogénea(109)(110) (111).

Las UDTs describen conjuntos de clones que son genéticamente similares entre sí, que son identificados por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes y que se diferencian de otros grupos genéticos del parásito (112)(113). El modelo de evolución de *T. cruzi* describe a esta especie como clonal, en que los descendientes son idénticos al genotipo fundador, sin descontar algunos eventos de recombinación genética en su historia evolutiva que habrían dado origen a híbridos a partir de linajes parentales, a modo de evolución reticulada (114).

La reciente aplicación de técnicas moleculares con gran capacidad de discriminación ha permitido clasificar a *T. cruzi* en distintos linajes genéticos o UDTs. Actualmente, por consenso internacional, las cepas de *T. cruzi* se clasifican en seis UDTs: TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI (115), más una séptima UDT identificada más recientemente y asociada a la infección en murciélagos denominada TcBat (116). Los componentes de TcI, II, V y VI se han asociados a ciclos de transmisión domésticas, mientras que TcIII y TcIV se han relacionado a ciclos selváticos (Fig. 13)

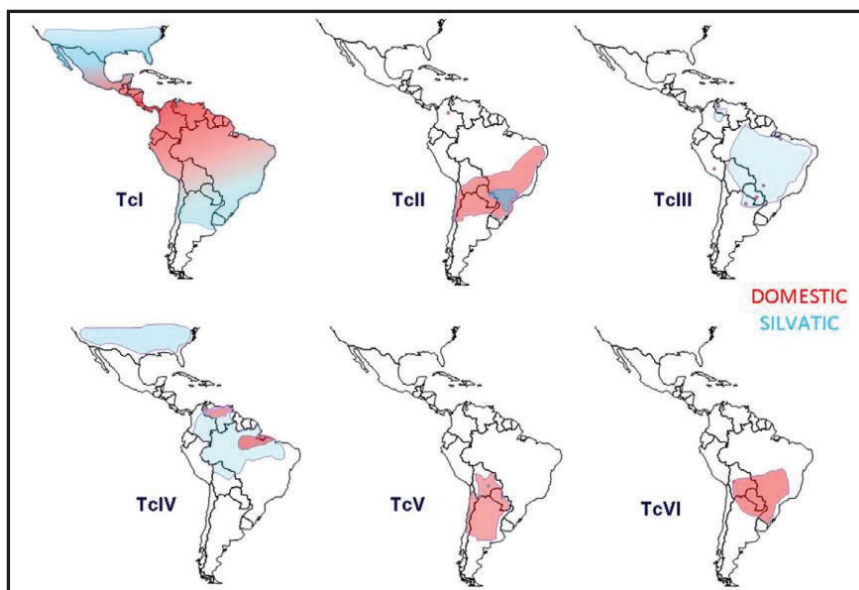


Figura 13. Distribución de las UDT de *T. cruzi*, en ciclos de transmisión doméstica y selvática. Imagen extraída Zingales *et al.*, 2012

TcI es la UDT más frecuente. Se encuentra ampliamente distribuida en las Américas, con particular preponderancia en América Central y México. Se ha asociado a mayor daño cardíaco que otras UDTs. TcII, TcV y TcVI se distribuyen principalmente en América del Sur, siendo TcV la más frecuente en Argentina, Bolivia y Paraguay y TcVI en la región del Gran Chaco. TcIII y TcIV generalmente se han aislado de reservorios salvajes y se desconoce su desarrollo en pacientes humanos (117). La heterogeneidad genética va más allá de la UDT y se han descrito sub-linajes, como ocurre en el caso de TcI donde están bien caracterizados (118). También se conoce la presencia de infecciones mixtas en las que coexisten varias UDTs simultáneamente.

La gran relevancia de la definición y el estudio de las diferentes UDTs ha sido redefinir algunos aspectos de esta enfermedad: la distribución geográfica de cada linaje dentro del área endémica, los distintos nichos ecológicos implicados en la transmisión vectorial, los ciclos de transmisión y un mejor conocimiento de la patogénesis de la infección (119). No está claro aún qué factores determinan las diferentes formas clínicas de la enfermedad, aunque no se puede descartar la influencia de factores asociados al hospedador, en verdad se debe reconocer el papel importante que juega la genética del parásito (120). Por ejemplo, en el cono sur se detectaron infecciones humanas con UDTs de TcII, V y VI en estudios que relacionaron los parásitos con características clínicas específicas. Dichos estudios partieron tanto de muestras de suero (121), cultivos aislados recuperados de muestras de sangre periférica (122) (123) (124), y en muestras de tejidos (76).

Por otro lado, debido al polimorfismo biológico, diferentes clones de una cepa pueden presentar tropismo por diferentes tejidos (músculo cardíaco, plexos mioentéricos del esófago y recto, etc.), convirtiéndose en un factor clave que determinará el curso clínico de la infección (125). También se ha podido demostrar la presencia de diferentes poblaciones de *T. cruzi* en la sangre y distintos tejidos, sugiriendo tropismo selectivo de algunas UDTs, que podría condicionar, por ejemplo, una mayor predisposición para la transmisión congénita o inclinar la balanza hacia la selección de ciertos linajes secundario tras un proceso de inmunosupresión (126)(127) (128) (129). Teniendo todo esto en consideración, Los estudios de tipado se han utilizado en la caracterización de brotes e incluso para determinar la posible selección de UDTs resistentes tras el tratamiento tripanocida (130).

1.8.2 Genotipado de *T. cruzi* por Multilocus PCR Convencional a partir de muestras clínicas

Los estudios de diversidad genética de *T. cruzi* son trascendentales para entender su patogenia en los seres humanos. La mayoría de los estudios que han examinado la asociación de las UDTs con manifestaciones clínicas de la enfermedad caracterizaron los parásitos a partir de muestras de sangre de pacientes, lo que limita la detección de poblaciones naturales con tropismo de tejido (sobre todo cardíaco y/o digestivo) en seres humanos.

Tras el consenso de clasificación en UDTs, se propusieron diferentes enfoques para analizar la diversidad genética de *T. cruzi* en especímenes biológicos y clínicos, con el fin de obtener una estrategia de genotipado factible y reproducible (117). En resumen, se dispone de tres enfoques recomendados para llevar a cabo el genotipado. El primero es una estrategia basada en tres marcadores secuenciales que implica la combinación de la amplificación de ADNr 24S α rDNA y RFLPs de amplicones derivados de loci para proteínas HSP60 y GPI (131). El segundo, incorpora PCR-RFLP del gen mitocondrial CO II, amplificación del espaciador no transcrito de genes para miniexón y del ADNr (132), y un tercer ensayo que utiliza PCR heminested basado en el análisis de *T. cruzi* utilizando los marcadores moleculares SL-IRac, SL-IR I y II, 24S α rDNA y A10 mediante PCR convencionales multilocus (122) (126) (133) (134).

El genotipado se puede realizar directamente a partir de diferentes muestras clínicas, sin necesidad de aislar el parásito antes de la extracción de ADN (134). La aplicación de estrategias de genotipado cuando se dispone de detección positiva por técnicas moleculares, es importante para determinar la presencia de infecciones mixtas, evitando una posible selección de cepas durante el tratamiento o aislamiento del parásito (134).

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

Los genotipos circulantes en sangre periférica pueden no revelar el universo completo de linajes parasitarios que infectan al paciente, ya que algunos de ellos podrían estar secuestrados en los tejidos y circulando esporádicamente en sangre con una carga parasitaria muy baja. Por lo tanto, la identificación de los genotipos de *T. cruzi* directamente en muestras clínicas de pacientes con megacolon chagásico, no solo ayudaría a una mejor comprensión de la epidemiología de la enfermedad, si no también sería de utilidad para un mejor manejo de esta patología.

2.2. OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo general

Obtener y caracterizar los genotipos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre y tejido de pacientes bolivianos con afección digestiva- megacolon.

2.2.2 Objetivos específicos

- Testar una nueva metodología para la detección de ácido desoxirribonucleico de *Trypanosoma cruzi* en el tejido del tracto digestivo.
- Valorar la carga parasitaria de *Trypanosoma cruzi* por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo en muestras de sangre y tejido de megacolon de los pacientes con la enfermedad de Chagas.
- Identificar los genotipos de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de los pacientes con megacolon.
- Identificar los genotipos de *Trypanosoma cruzi* en tejido reseccionado de los pacientes con megacolon.
- Correlacionar los genotipos encontrados en las muestras analizadas en los pacientes con la enfermedad de Chagas.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Población analizada

3.1.1 Diseño del estudio, inclusión de participantes y periodo de estudio

Diseño: este trabajo fue diseñado como un estudio prospectivo transversal de casos y controles de pacientes que acudían para tratamiento quirúrgico de megacolon que requería resección de segmentos disfuncionales. Los participantes fueron reclutados en tres centros especializados en cirugía situados en tres municipios del departamento de Cochabamba, Bolivia:

- Hospital Gastroenterológico Boliviano Japonés Cercado (Cochabamba).
- Centro Médico Quirúrgico Fundación Pietro Gamba (Anzaldo).
- Hospital del Niño Manuel Ascencio Villarroel (Punata).

En total, se **incluyeron** 40 pacientes crónicos con EC (serología anti-*T. cruzi* positiva) con diferentes signos clínicos digestivos. También fueron incluidos como controles cinco pacientes que padecían otros síndromes digestivos distintos de la EC. De cada participante se obtuvo muestra sanguínea para realización de diagnóstico serológico y molecular, así como muestras de tejido del tracto digestivo para diagnóstico molecular. Con el ADN positivo extraído se procedió a caracterizar las UDT de *T. cruzi*.

Los **criterios de inclusión** fueron:

- Individuos mayores de 18 años.
- Serología positiva para Chagas confirmada mediante dos ensayos serológicos convencionales comerciales: Chagatest ELISA® Recombinante v3.0 (Wiener lab, Rosario, Argentina) y Chagatek ELISA basado en antígeno de lisado de parásitos enteros (Laboratorio Lemos, Buenos Aires, Argentina).
- Criterios clínicos de daño digestivo y evidencia de megacolon por pruebas de imagen.
- Firma del consentimiento informado, conforme estaban de acuerdo en participar en el estudio propuesto.

Periodo de estudio: inclusión de los participantes en el presente estudio tuvo lugar entre julio de 2014 y julio de 2016, y se realizó en forma consecutiva ofreciendo el reclutamiento a todos aquellos sujetos que cumplieran con los criterios de inclusión anteriormente descritos, según su

afluencia y frecuencia de visitas programadas en los tres centros especializados donde se realizan las intervenciones quirúrgicas digestivas (megacolon).

Las muestras fueron colectadas, en cada centro especializado, por personal cualificado en las técnicas y equipos de rutina utilizados. Se proveyó a los centros del material para la toma de muestra en los mismos.

3.2 Métodos

3.2.1 Comités de Ética.

El protocolo del estudio y el formulario de CI fueron revisados y aprobados por los comités de ética de la Fundación CEADES (N° 0990-0279/FWA:00024189; Cochabamba, Bolivia) y el del Hospital Clínic de Barcelona (2013/8736; Barcelona, España).

3.2.2 Recolección, extracción y conservación de muestras

3.2.2.1 Muestras de sangre entera

Las muestras de sangre fueron recolectadas por punción venosa, extrayéndose 10 mL de sangre fraccionada en dos tubos: 5 mL en tubo con EDTA y mezclada con solución de Guanidina 6M y EDTA 0,2 M en una relación 1:1 que fue añadida en laboratorio; y otros 5 mL en tubo sin anticoagulante.

3.2.2.2 Muestra de tejido del tracto digestivo (megacolon)

El tamaño aproximado de las muestras de tejido fue de 1 a 2,5 cm² por pieza. Se tomaron muestras por duplicado de tres puntos diferentes dentro del segmento disfuncional resectado: segmentos distal, central y proximal. De cada pieza, la mitad se conservó para cultivo en un tubo cónico de propileno de 15 mL con una solución de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9% y 100 µg/mL de gentamicina; la otra mitad se conservó en un tubo cónico con etanol al 70% para realizar una qPCR multiplex (135) (136).

La extracción y purificación de las muestras de ADN a partir de las muestras de sangre y tejido se realizó mediante un método combinado con un equipo semiautomatizado KingFisher Duo Prime - MagMax DNA multi-sample ultra 2.0 kit.

3.2.3 Técnicas de diagnóstico de la infección por *T. cruzi* empleadas según el tipo de muestra clínica.

En la tabla 1 se resumen las técnicas de diagnóstico empleadas según las muestras recolectadas.

PROCEDIMIENTO		SANGRE SIN ANTICOAGULANTE	SANGRE CON EDTA	TEJIDO
Muestra recolectada				
Serología Chagas 1.elisa Antígeno total 2.elisa Antígeno recombinante		SI	NO	NO
Diagnóstico molecular		NO	SI	SI
Descripción del diagnóstico molecular	Pre-tratamiento de muestra	SI	NO	SI
	Extracción de ADN	NO	SI	SI
	qPCR <i>T. cruzi</i>	NO	SI	SI
Identificación de los UDTs <i>T.cruzi</i>		NO	SI	SI

Tabla 1. Procedimientos de laboratorio según el tipo de muestras clínicas recolectadas.

3.2.3.1 Serología Chagas

Se procedió a la obtención del suero por centrifugación a 4.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. El suero fue utilizado para realizar la serología de Chagas que se confirmó mediante dos ensayos comerciales: Chagatest ELISA® Recombinante v4.0 (antígenos recombinantes 1, 2, 13, 30, 36 y SAPA) (Wiener laboratorio Wiener, Rosario, Argentina), y Chagatek ELISA basado en antígenos lisado de parásito entero (Laboratorio Lemos, Buenos Aires, Argentina). Al tratarse de dos técnicas comerciales se siguieron las instrucciones descritas en el inserto de los kits tal como describen los fabricantes. Las lecturas de la densidad óptica (D.O) se realizaron en un espectrofotómetro Biotek modelo ELx800. Los criterios de interpretación de los resultados con el instrumental óptico según presencia o ausencia de anticuerpos anti *T. cruzi* se determinaron relacionando la absorbancia de la muestra respecto al valor del umbral o punto de corte determinado según el prospecto incluido en cada kit. Se consideraron

no reactivas aquellas muestras con absorbancias menores al punto de corte, y se consideraron como muestras reactivas aquellas que rindieron absorbancias mayores o iguales al punto de corte.

3.2. 3.2 Cultivo de tejidos

Las muestras de tejido digestivo en tampón NaCl 0,9% y gentamicina se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio, (aproximadamente unas 4 horas), donde se lavaron inmediatamente tres veces con el mismo tampón trabajando en una campana de flujo laminar (BOECO) para evitar posibles contaminaciones. A continuación, se tomaron de cuatro a cinco fragmentos de tejido con un sacabocado de un diámetro de 3 mm de diferentes sitios de las muestras, logrando obtener piezas de tejido de diferentes sitios, que se trituraron conjuntamente en un mortero de vidrio. Una vez trituradas, la “sopa” de solución tampón NaCl 0,9% y muestra obtenida se inoculó en tres tubos con medio de cultivo LIT. Este procedimiento se repitió para cada una de las tres muestras recogidas (segmentos distal, central y proximal). Los tubos se incubaron a 26 °C y fueron examinados microscópicamente a los 30, 60 y 90 días post-inoculación. Este procedimiento se realizó en el laboratorio de Parasitología del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBISMED; Facultad de Medicina, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia).

3. 2.3.3 Métodos Moleculares

Pre tratamiento de la muestra (tejidos): solamente las muestras de tejido requirieron un pre tratamiento debido a la naturaleza de la muestra. El mismo día de la recolección, las muestras conservadas en etanol al 70% se lavaron tres veces con abundante etanol al 70% para eliminar contaminantes, durante 5 minutos cada lavado, trabajando en una campana de flujo laminar (LABCON). Una vez lavados, cada trozo de tejido se colocó individualmente, en un tubo cónico de 15 ml con etanol al 70% y se almacenó a -80 °C hasta su manipulación.

Se observaron alteraciones patológicas y potenciales signos de progresión de la enfermedad en las muestras de tejido observado durante el procesado de cada muestra. Trabajando bajo campana de flujo laminar (LABCON), fueron sometidas a fragmentación en trozos más pequeños de aproximadamente 3 a 4 mm con un bisturí estéril, el cual fue rociado con nitrógeno

líquido para contribuir aún más a la fragmentación y homogeneización. Se almacenaron aproximadamente 40 mg de cada tejido pulverizado en tubos Eppendorf de 1,5 ml a -20 °C. Para minimizar el riesgo de contaminación entre muestras, todo el equipo utilizado se lavó minuciosamente con una solución de hipocloruro de sodio al 10% y se irradió con luz ultravioleta durante 15 minutos entre muestra y muestra.

Cuando fueron descongeladas, antes de ser utilizadas para la extracción del ADN, cada muestra pulverizada se digirió durante la noche a 55 °C en 400 µL de una solución que contenía urea 4 M, Tris 200 mM, NaCl 20 mM, EDTA 200 mM y 40 µL de proteinasa K (20 mg/mL, Roche Applied Science) a pH = 7,4.



Figura 14. Sobrenadante de muestras de tejido pulverizado y digerido con tampón de lisis utilizado para la extracción y purificación del ADN (fuente propia).

3.2.3.4 Extracción y purificación del ADN a partir de muestras clínicas (sangre y tejido)

La extracción y purificación del ADN a partir de muestras de sangre (300 µl) y tejido (300 µl del sobrenadante obtenido, ver subsección anterior), se realizó siguiendo un procedimiento semiautomático basado en el kit comercial de perlas magnéticas DNA Multi Sample ultra 2.0 (Applied Biosystems, Lituania), y el robot King-Fisher Duo Prime (Thermo Fisher, Lituania). Se siguieron minuciosamente las instrucciones del fabricante, y se empleó un volumen de elución final de 100 µL del tampón de elución del kit. El ADN purificado se almacenó a -20 °C hasta el análisis molecular. Antes del mismo, todas las muestras de ADN obtenido fueron analizadas mediante el espectrofotómetro Epoch (Biotek) para determinar la relación

A260/A280, que debía estar entre 1,8 y 2,0 correspondiendo a un ADN de alta pureza (90-100%).

3.2.3.5 PCR en tiempo real para la detección de *T. cruzi*

Para hacer el diagnóstico molecular y poder determinar la parasitemia en curso de los pacientes con serología positiva se siguió el protocolo de qPCR descrito por (77), que amplifica un fragmento de 166 pb de las repeticiones satélite del ADN del genoma nuclear del parásito.

La amplificación del ADN específico del parásito se realizó utilizando los siguientes cebadores (5'-3'): Cruzi 1 STCGGCTGATCGTTTTTCGA; Cruzi 2 AATTCCTCCAAGCAGCGGATA; Cruzi 3 FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB (sonda TaqMan).

Además, se incluyó un control de amplificación interno (IAC) endógeno dirigido al gen de la ARNasa P humana (Applied Biosystems) para monitorear el proceso (90). En todos los ensayos se incluyeron controles positivos de amplificación alta y baja, que equivalían respectivamente a 10 fg/μl y 1 fg/μl de ADN purificado de la cepa CL-Brener de *T. cruzi* (UDT TcVI). Cada ronda de amplificación incluía así mismo un control negativo compuesto por ADN extraído de una muestra de tejido de un paciente con serología negativa, y un *non template control* (NTC) que consistió básicamente en un tubo con agua ultrapura de grado molecular en lugar de ADN.

La qPCR se realizó en un termociclador CFX-96 (BioRad, Hercules, EE.UU.) de acuerdo a los siguientes pasos de incubación: 2 min a 50 °C; 1 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C y 1 min a 58 °C.

La estimación de la carga parasitaria en las muestras positivas se realizó utilizando una curva estándar construida en base a diluciones seriadas 1/10 de una repetición de oligonucleótido de satADN sintético (material amablemente donado por el Dr. Alejandro Schijman) partiendo de una concentración de 10⁵ hasta 10 copia/μL y 25 hasta 25000 ADNsat Eq.tejido/mg según el tipo de muestra, esta curva patrón sintética permitió estimar la carga parasitaria independientemente de la cepa del parásito o la UDT lo que, a su vez, permitió la comparación directa de cargas parasitarias entre muestras (137). Para construir esta curva estándar se mezcló ADN total (purificado por el mismo método descrito para las muestras clínicas) obtenido de un

pool de ADN de tejidos digestivos o sangre de individuos seronegativos que se utilizó como una matriz equivalente a las muestras clínicas infectadas con ADNsat sintético de *T. cruzi*.

3. 2.3.6 Tipificación mediante estrategias de amplificación de las UDTs de *T. cruzi*

La caracterización de las UDTs para el genotipado de *T. cruzi* se basó en PCRs convencionales multilocus, a partir de una combinación de metodologías publicadas previamente, utilizando las dianas de amplificación SL-IRac, SL-IR I y II, 24S α rDNA y A10 (126) (138) (134). (Fig. 15). Algunos ensayos fueron de tipo PCR touchdown, en los que, una primera parte, que dura 20 ciclos, se empieza con una temperatura de hibridación elevada y se va disminuyendo hasta la temperatura de hibridación óptima, lo que contribuye a evitar la formación de dímeros de cebadores y permite que se produzca cantidades masivas de ADN. En la segunda ronda de PCR, de tipo *heminested*, se utiliza uno de los cebadores de la primera ronda y un nuevo cebador interno de manera que el amplicón de la segunda ronda de PCR es más corto que el de la primera con el fin doble de aumentar la sensibilidad para detectar *T. cruzi* y poder realizar la genotipificación.

Los fragmentos amplificados por PCR convencional fueron revelados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3%:

- En la sala de post-PCR, preparar agarosa al 3% pesar la agarosa y transferirla a un matraz Erlenmeyer., según tamaño de cubeta.
- Agregue el volumen de tampón Tris/Borate/EDTA (TBE) 1X, marque el volumen de la suspensión en el matraz Erlenmeyer, utilizando un marcador permanente.
- Derrita la agarosa usando un horno de microondas homogenizarlo y ver a tras luz Si es necesario, completar el volumen con más TBE 1-, hasta la marca del matraz Erlenmeyer.
- Añadir el tinte fluorescente de ácido nucleico en el gel (GelRed) a una concentración final de 0,1X y volver a homogeneizar.
- Verter la agarosa fundida sobre la cubeta de electroforesis preparada. Inserte el peine y espere la gelificación de la agarosa.
- Una vez gelificado la agarosa, coloque la cubeta que contiene el gel en la cámara de electroforesis.
- Añadir TBE 1X hasta cubrir el gel, y retirar con calma el peine.
- Cargue en los pocillos las muestras y marcadores de peso molecular (escaleras de ADN) premezcladas con el tampón de carga.

- Coloque la tapa en la cámara de electroforesis y conecte los cables a la fuente de alimentación de energía.
- Ejecute la electroforesis a 90 V, hasta que el frente del colorante llegue al fondo del gel. Apague la fuente de alimentación.
- La interpretación se realizó siguiendo el siguiente diagrama de PCR convencional:

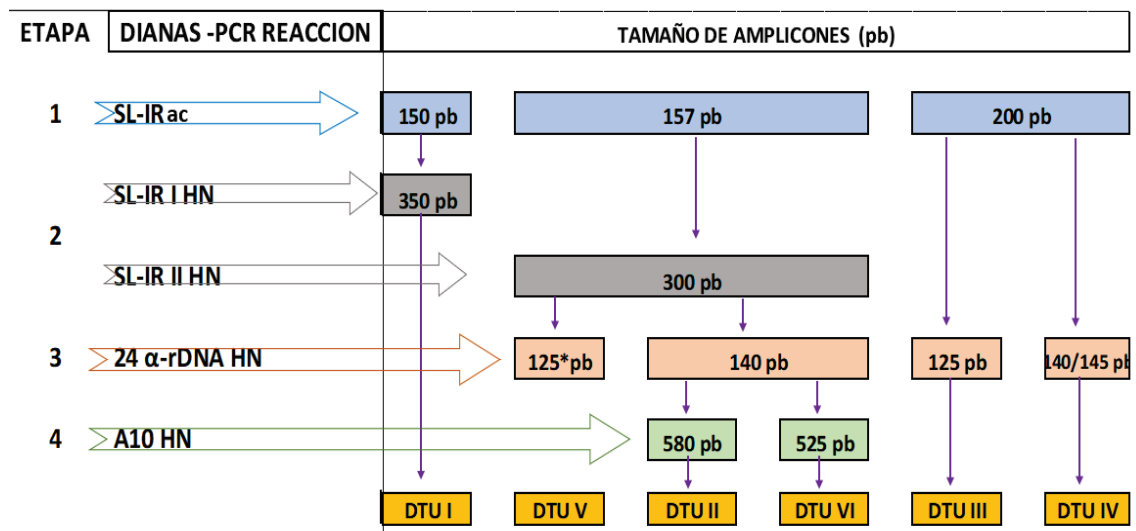


Figura 15. Diagrama de identificación de las UDTs de *T. cruzi* por PCR multilocus. (Esquema adaptado de “Burgos *et al.*, 2007”).

3.4 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software Microsoft Office Excel (versión 2010) donde se calcularon frecuencias y/o porcentajes de eventos. Generalmente, los valores se muestran como media con desviación estándar (DE). Debido a la posible presencia de inhibidores en la qPCR o un rendimiento deficiente de la extracción de ADN, aplicamos los criterios de Tukey para detectarlos, que se basa en el concepto de rango intercuartil (IQR) y es útil para detectar valores atípicos en conjuntos de datos, o análisis de “outliers” de la ronda de extracción correspondiente. Según dicho criterio de Tukey, serían outliers aquellas determinaciones con $Cts > \text{percentil } 75 + 1.5 \times \text{la distancia intercuartil}$ (139)

Como medida de la concordancia se utilizó el índice de kappa (κ) que es una medida estadística que ajusta el efecto del azar en la proporción de la concordancia observada, sirviendo para determinar la concordancia entre dos examinadores en sus correspondientes clasificaciones de N elementos en C categorías mutuamente excluyentes.

La ecuación para κ es:

$$\kappa = \frac{\text{Pr}(a) - \text{Pr}(e)}{1 - \text{Pr}(e)}$$

donde $\text{Pr}(a)$ es el acuerdo observado relativo entre los observadores, y $\text{Pr}(e)$ es la probabilidad hipotética de acuerdo por azar, utilizando los datos observados para calcular las probabilidades de que cada observador clasifique aleatoriamente cada categoría. Si los evaluadores están completamente de acuerdo, entonces $\kappa = 1$. Si no hay acuerdo entre los calificadores distinto al que cabría esperar por azar (según lo definido por $\text{Pr}(e)$), $\kappa = 0$.

A la hora de interpretar el valor de κ es útil disponer de una escala como la mostrada en la Tabla 2

Valoración del Índice Kappa	
Valor de κ	Fuerza de la concordancia
< 0.20	Pobre
0.21 - 0.40	Débil
0.41 - 0.60	Moderada
0.61 - 0.80	Buena
0.81 - 1.00	Muy buena

Tabla 2. Escala del índice kappa para la respectiva interpretación. (Altman DG. Practical statistics for medical research. New York: Chapman and Hall; 1991).

IV. RESULTADOS

4. Resultados

4.1 Pacientes incluidos en estudio

En total, se incluyeron en el estudio 40 participantes que presentaron serología positiva para *T. cruzi* y cinco pacientes con serología negativa como controles. La edad media de los participantes fue de 61 años (rango 40-80 años); el 45% (18/40) de eran mujeres y 55% (22/40) eran hombres.

Según la clasificación clínica, el signo predominante observado dentro del grupo de pacientes con EC fue el dolicomegacolon 65% (26/40), que se caracteriza por elongación y dilatación del colon. Por otro lado, 15% de los pacientes (6/40) fueron diagnosticados clínicamente como megasigmoide o sigmoide, y otro 20% (8/40) fueron diagnosticados con vólvulo y pudieron restablecer su tránsito intestinal mediante descompresión por endoscópica. Sólo el 5% (2/40) presentó síntomas cardíacos y digestivos o afección mixtos. En el grupo control, 2/5 personas con vólvulo lograron restablecer su tránsito intestinal mediante laparoscopia de Hartmann, mientras que tres presentaron dolicomegacolon, atribuido a otras patologías diferentes al Chagas (Tabla 3).

Serología Chagas	Sintomatología								Total
	Dolicomegacolon		Megasigmoide		Volvulo		Megacolon/ cardiomegalia		
	M	F	M	F	M	F	M	F	
Positivo	15	11	4	2	2	4	1	1	40
Negativo	3	0	0	0	0	2	0	0	5
Total	18	11	4	2	2	6	1	1	45

Tabla 3. Clasificación de la cohorte de estudio en términos de lecturas clínicas y serológicas.

No se pudo recolectar muestras de sangre total de tres pacientes (MGC 12, MGC31, y MGC 42), pero si se recolecto muestras de tejido. Estos pacientes tenían un resultado positivo para Chagas en su historia clínica al momento de intervención quirúrgica. Por otro lado, de otros dos pacientes no se obtuvieron las muestras de tejido (MGC08 y MGC 26), pero sí que

se tomaron las muestras de sangre (Tabla 4). Por tanto, se analizaron un total de 37/40 muestras de sangre y 38/40 muestras de tejido de pacientes con serología positiva para Chagas con ambos tipos de muestra en los 5 participantes del grupo control.

Código	Muestra de sangre	Muestra de tejido
MGC12	NR	Si R
MGC31	NR	Si R
MGC 42	NR	Si R
MGC08	Si R	NR
MGC26	Si R	NR

Tabla 4. Detalle de pacientes en los que no se recolectó alguna muestra clínica

NR: No recolectado, Si R: Si recolectado

4.2 Cultivos de tejido en medio LIT

A pesar de los esfuerzos realizados en el intento de aislar parásitos por medio del cultivo en medio LIT de las muestras de tejido reseccionadas, no se pudieron observar parásitos en ninguna de éstas. Todas las muestras presentaron signos de contaminación bacteriana, probablemente debido a la naturaleza de las mismas.

4.3 Extracción de ADN

En general, la extracción y purificación del ADN, tanto a partir de muestras de sangre como de tejido, con el sistema semiautomático basado en perlas magnéticas funcionó bien. La relación A260/A280 del ADN purificado a partir de las muestras de tejido alcanzó un valor medio de 1,95 (SD±0,062) para una cantidad media de 399,48 ng/μl (±374.93). Con las muestras de ADN purificado a partir de la sangre completa, la relación A260/A280 fue también buena (1,94 ± 0,119), pero la cantidad media de ADN fue menor 85,83 ng/μl (± 47,16).

4.4 -PCR en tiempo real para la detección de *Trypanosoma cruzi*

La sensibilidad de la qPCR para *T. cruzi* con muestras de ADN obtenidas a partir de tejido, tomando los tres puntos de muestreo, fue del 41,7% (16/38). En comparación, el resultado logrado cuando se toma en consideración una sola muestra o un solo punto de muestreo fue $\leq 25\%$.

Las diferencias entre las medias con un IC del 95% observada muestra una media significativamente mayor con muestras de sangre 59,5% (22/37) esta *versus* al tejido en relación a la positividad de PCR para *T. cruzi*. (Fig. 16).

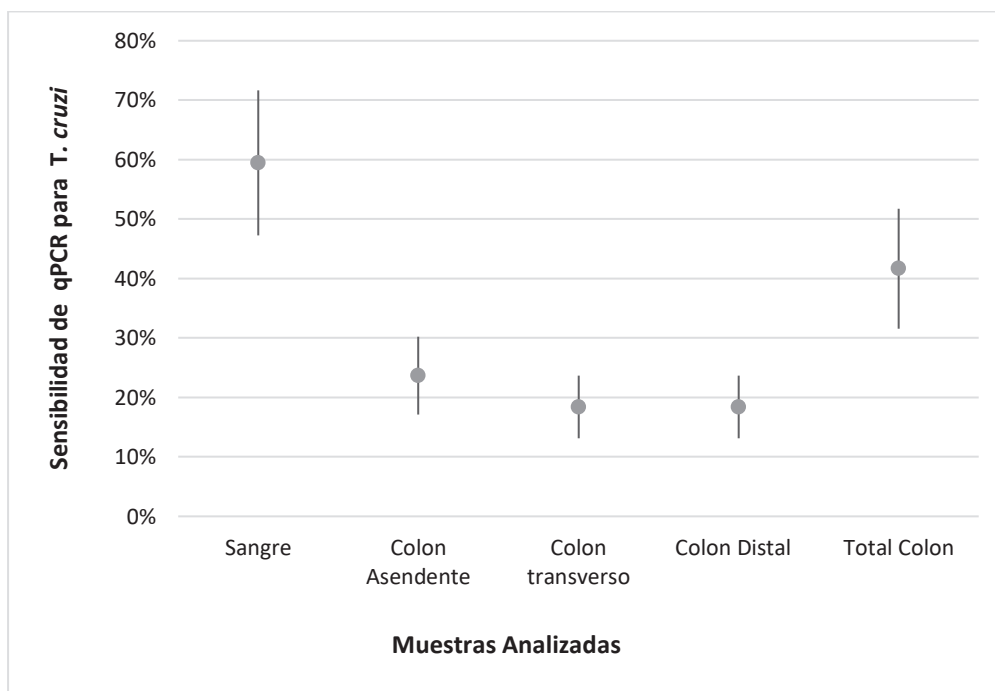


Figura 16. Sensibilidad de la qPCR en relación a las muestras de tejido analizadas de pacientes incluidos en el presente estudio.

El coeficiente kappa de Cohen respecto al diagnóstico en paralelo de *T. cruzi* en muestras de sangre y de tejido fue de 0,239, expresado como 24% de concordancia, interpretable como débil, según los acuerdos observados más allá del azar.

El ADN extraído no mostró signos de degradación según las lecturas promedio del umbral del ciclo de amplificación (Ct) del gen endógeno de la ARNasa P humana que se amplificó como control interno en todas las muestras. El mismo fue evaluado según los criterios de Tukey para los outliers por tanda de extracción (Fig. 17).

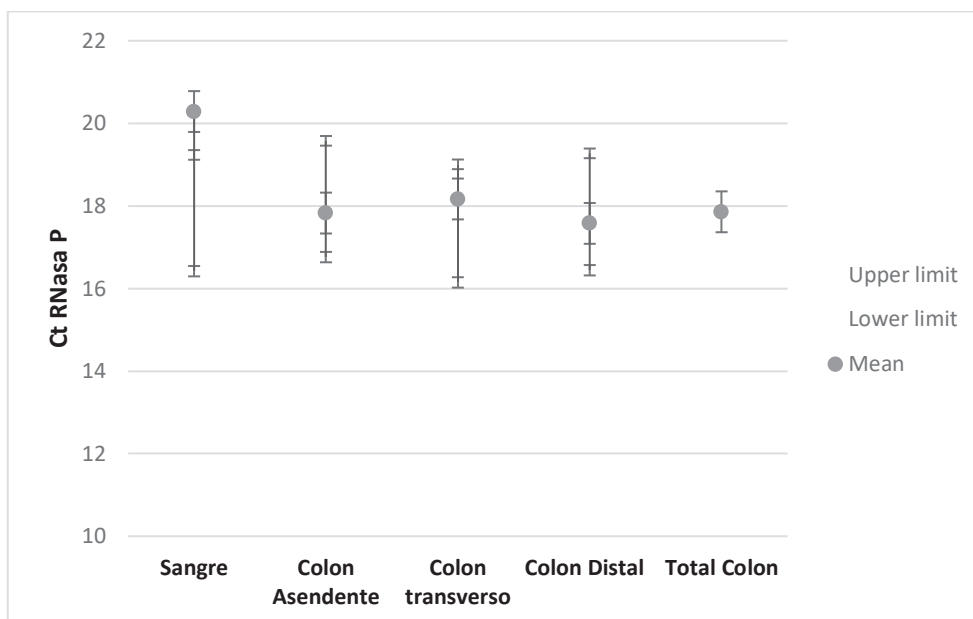


Figura 17. Amplificación de gen humano ARNasa P como control interno de la qPCR. Para cada valor promedio se muestran los límites superior e inferior de significación estadística del IC95 %, intervalo de confianza del 95%.

Al analizar los resultados de qPCR en relación el estado clínico de cada caso de estudio, se observó que las muestras que mostraron una mayor tasa de positividad fueron las obtenidas de pacientes con megasigmoide (5/6) y restitución del tránsito intestinal por vólvulo (3/4) (Fig. 19; Tabla 5). Por el contrario, el grupo clínico más numeroso con dolico megacolon registró siete detecciones positivas de ADN del parásito sobre 26 casos con esta patología de los 40 incluídos.

La relación entre el diagnóstico clínico y la carga parasitaria media, expresada en copias satADN Eq.tejido/mg de *T. cruzi*, osciló entre 6,34E+02 (66.09) copias satADN Eq.tejido /mg con el diagnóstico de dolico megacolon y 1,45E+07 (128.64) copias satADN Eq.tejido /mg también en pacientes con dolico megacolon (Tabla 5; Fig. 19).

En general, la cuantificación de la carga parasitaria mostró una alta heterogeneidad para *T. cruzi*, con valores más altos en las regiones distales, seguido por la región transversal y el colon ascendente en todos los escenarios clínicos (Tabla 5).

En cambio, con las muestras de sangre se determinaron $5,87 \times 10^1$ copias / μ L en el diagnóstico de megacolon/cardiomegalia, y $9,93 \times 10^3$ copias / μ L en aquellos pacientes diagnosticados con dolicomegacolon (Fig.18).

Diagnóstico clínico	Segmento de tejido de colon (valores Ct medios y cargas parasitarias)								
	Extremo proximal ascendente Media (SD)			Extremo central transversal Media (SD)			Extremo distal descendente Media (SD)		
	Cq <i>T. cruzi</i>	copias satADN Eq.tejido /mg	Ct RNasaP	Cq <i>T. cruzi</i>	copias satADN Eq.tejido /mg	Ct RNasaP	Cq <i>T. cruzi</i>	copias satADN Eq.tejido /mg	Ct RNasaP
Vólvulo	33,51 (9,85)	2,3E+3 (2400)	17,54 (1,40)	33,54 (12,37)	5,77E+03 (85,23)	18,61 (1,53)	ND	0	17,35 (1,37)
Dolicomegacolon	36,58 (14,77)	7,68E+03 (21,04)	17,83 (1,41)	36,11 (13,51)	6,34E+02 (66,09)	18,17 (1,41)	28,77 (11,80)	1,45E+07 (128,64)	17,58 (1,43)
Megasigmoides	30,33 (14,52)	3,53E+04 (21,98)	17,86 (1,46)	32,84 (13,26)	3,62E+06 (61,23)	18,28 (1,42)	32,69 (11,32)	2,22E+04 (115,31)	17,44 (1,39)
Megacolon/ cardiomegalia	35,86 (0,67)	4,42E+05 (65,22)	19,32 (0,43)	ND	0	0	25,1 (0,043)	8,83E+05 (11762,33)	17,70 (0,12)

Tabla 5. Carga parasitaria expresada en copias de satADN Eq.Tejido/mg de *T. cruzi* en los sitios de recolección de tejidos y diferentes formas clínicas de EC digestiva.

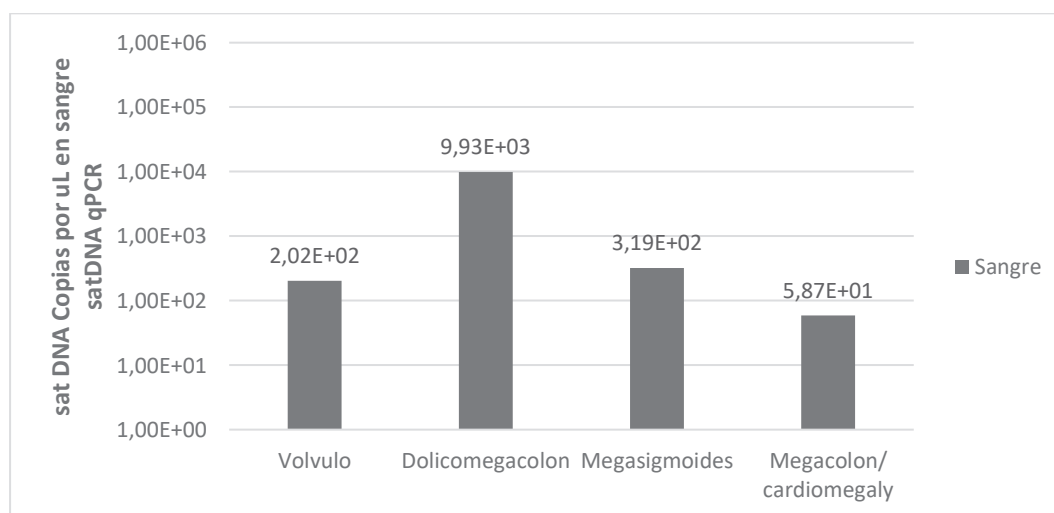


Figura 18. Media de la carga parasitaria detectada en muestras de sangre según el diagnóstico clínico.

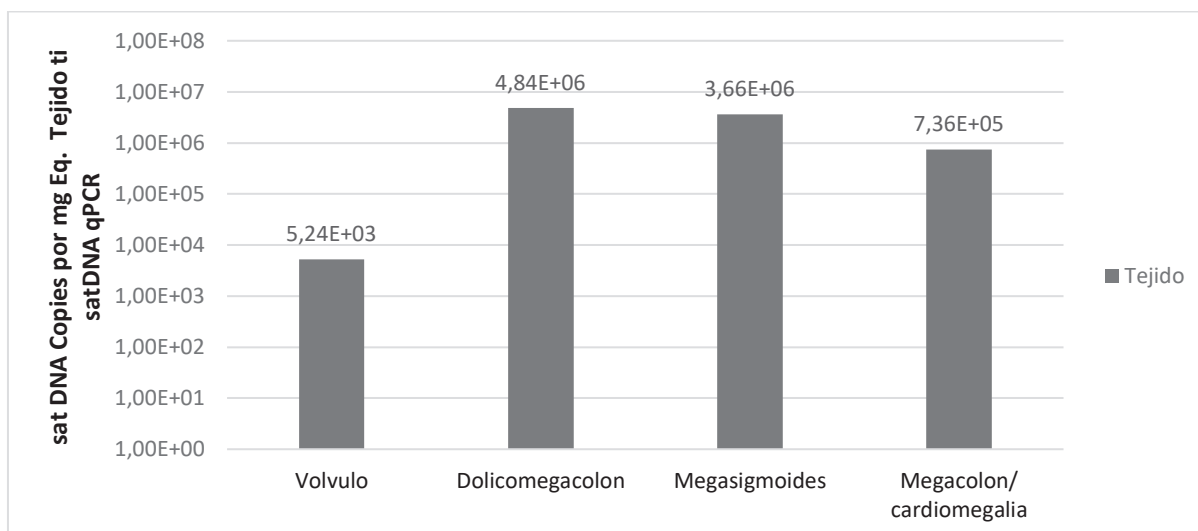


Figura 19. Media de la carga parasitaria detectada en muestras de tejido según el diagnóstico clínico.

4.5 Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* identificados en las muestras de sangre y tejido

Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa (3%) de los amplicones obtenidos por PCRs convencionales según la diana de amplificación para identificar las UDTs de *T. cruzi* a partir de muestras de tejido y sangre de pacientes con megacolon chagásico se muestran en la Fig. 20.

Fue posible identificar tres UDTs en las muestras analizadas con qPCR positiva y una Ct ≤ 33 . De las muestras analizadas, cumplieron con esos criterios 10 muestras de sangre y seis de tejido (Tabla 5).

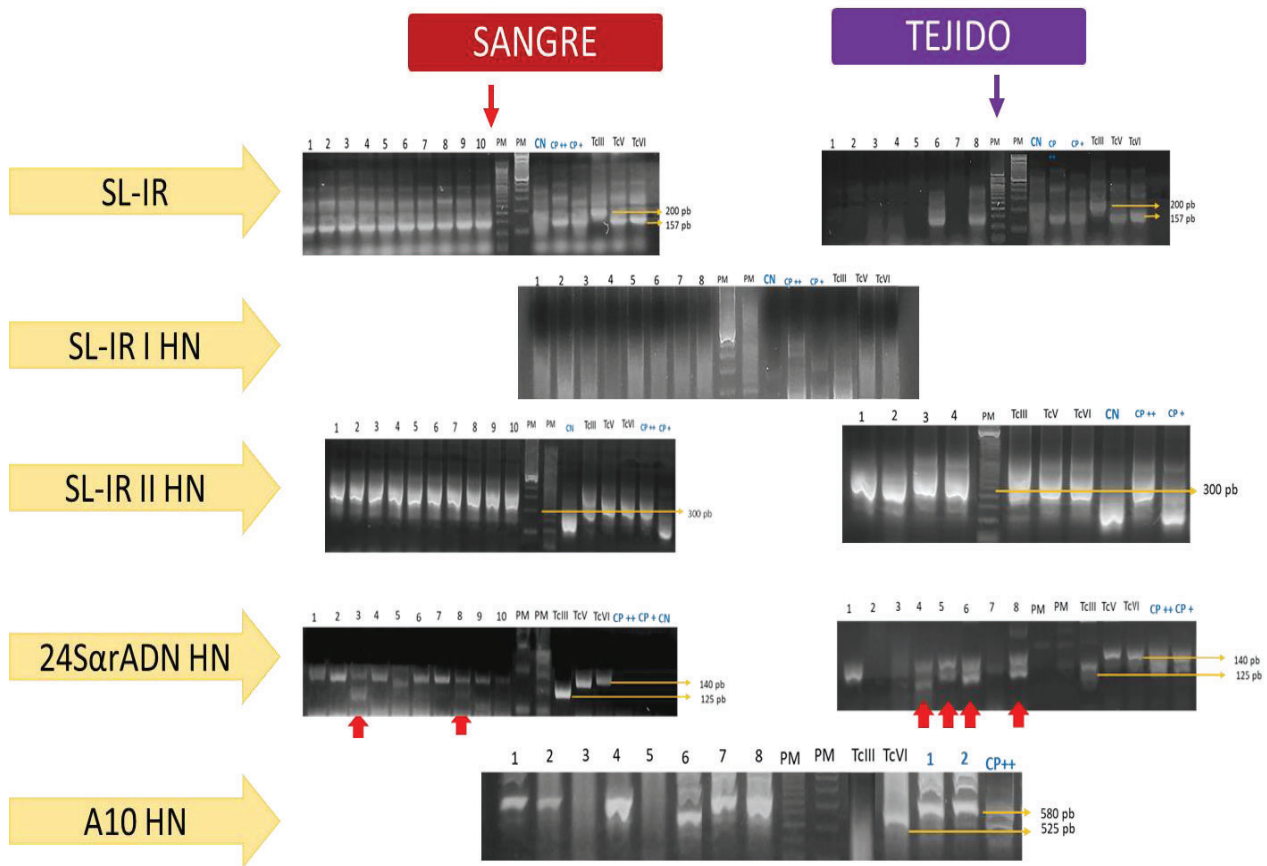


Figura 20. Amplicones identificados según la diana de amplificación de las UDTs de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido.

En las muestras de sangre se identificaron las UDTs TcII, V y VI, con predominio de TcII (50%, 5/10), seguida por TcV y mixta TcII/VI en un 20% (2/10), así también se tiene en 1/10 TcVI (Tabla 6).

En las muestras de tejido de los pacientes con afección de megacolon chagásico, se identificaron las UDTs Tc II y V, con predominio de TcV en el 67% (4/6) de las muestras y TcII en un 33% (2/6) (Tabla 6).

En cinco pacientes con resultados de qPCR positiva en ambas muestras (sangre y tejido) se pudo determinar que tres de ellos (60%) presentaban infecciones mediadas por aislados de las UDTs TcII y TcV.

En un paciente de los cinco se identificó TcII en ambos tipos de muestras (sangre y tejido). En otro paciente se identificó TcV en ambos tipos de muestra, mientras que el tercero tenía una infección mixta con predominancia de TcII en sangre y de TcV en tejido (MGC15; Tabla 6).

En los dos pacientes de este subgrupo de cinco, se identificó TcII y TcVI sólo en muestra de sangre ya que no se logró amplificación alguna por PCR convencional en las muestras de tejido (Tabla 6).

En aquellos pacientes con cargas parasitarias bajas según los resultados de qPCR ($Ct \geq 33$) en sangre y tejido, se intentó hacer la caracterización de UDTs por PCR convencional multilocus, pero no se lograron obtener amplicones.

Tipo de muestra	Código de muestra	Sangre		TEJIDO	
		qPCR Copias/ μ L	UDTs <i>T. cruzi</i>	qPCR copias satADN Eq. tejido/mg	UDTs <i>T. cruzi</i>
Sangre y tejido	MGC 03	3,5E+02	II, VI	9,20E+03	ND
	MGC09	2,0E+03	II	1,10E+07	II
	MGC10	3,2E+02	V	3,50E+06	V
	MGC15	5,9E+01	II	8,83E+05	V
	MGC36	1,2E+02	II	7,57E+03	ND
Sangre	MGC13	1,7E+03	II, VI	ND	0
	MGC16	5,1E+02	V	ND	0
	MGC06	1,0E+03	II	1,20E+02	ND
	MGC40	3,3E+03	VI	ND	0
	MGC41	1,2E+03	II	ND	0
Tejido	MGC11	ND	0	3,62E+06	V
	MGC19	ND	0	5,39E+03	II
	MGC 42	Sin muestra	0	4,40E+04	V

Tabla 6. Genotipos (UDTs) de *T. cruzi* en muestras de sangre y tejido de pacientes con megacolon chagásico con qPCR positiva. ND: no determinada; 0: muestra no analizada para UDTs por PCR negativa.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

Según Ward y colaboradores (140), la EC crónica en humanos se caracteriza por la persistencia a largo plazo del parásito a niveles que son difíciles de monitorizar con precisión, incluso utilizando técnicas basadas en PCR de alta sensibilidad. De aquí la dificultad y escasez de estudios de caracterización.

Diversas variables, como el clima, el índice de vegetación y la temperatura, tienen una influencia significativa en el ciclo de transmisión de esta enfermedad transmitida por vectores (141). La información disponible de diferentes estudios sugiere que los UDTs del parásito *T. cruzi* detectados en humanos, independientemente de su presentación clínica, proporcionan información clave sobre los principales UDTs que circulan en los ciclos de transmisión doméstica en una región determinada (141).

Siguiendo la recomendación actual de la OMS/OPS, los pacientes incluidos en el estudio fueron diagnosticados de EC, mediante dos pruebas comerciales serológicas basadas en principios técnicos de antígenos diferentes para detectar los niveles anti-*T. cruzi* IgG. Todos los pacientes incluidos fueron positivos por ambas pruebas y no se obtuvo ningún resultado discordante. Todos los pacientes incluidos en el estudio posiblemente se infectaron en la infancia y desarrollaron megacolon chagásico a lo largo de sus vidas, causando Chagas crónico con desarrollo de la forma digestiva y con diagnósticos clínicos de dolicomacolon, megasigmoide, vólvulo y afectación mixta por megacolon/cardiomegalia. Las formas avanzadas de estas formas clínicas de afectación digestiva causan una gran morbilidad en los pacientes y, en algunos casos, también pueden provocar mortalidad debido a complicaciones potencialmente letales, motivo por el cual los pacientes fueron tratados quirúrgicamente como tratamiento a su dolencia.

Se estima que entre el 10 y el 20% de los sujetos crónicamente infectados con *T. cruzi* en Cochabamba (Bolivia), presentan síntomas digestivos (142). A nivel gastrointestinal, la enfermedad de Chagas puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, siendo las localizaciones más afectadas el colon y el esófago (143), lo que fue observado dentro del grupo de pacientes incluidos. También se incluyeron en el estudio, pacientes con diagnóstico clínico de dolicomacolon.

gacolon y vólculo con serología negativa para Chagas, en los cuáles, la afección digestiva podría deberse a otras causas comunes en Bolivia, como vivir en regiones por encima de los 3000 metros de altitud o con el hábito de masticar hojas de coca por largos periodos de tiempo (142).

En el presente estudio se recolectaron muestras de tejido digestivo, ricas en contenido mucoso, de pacientes chagásicos que acudieron a los centros sanitarios por complicaciones digestivas graves a nivel del colon y requirieron tratamiento quirúrgico con resección de segmentos disfuncionales. La recolección de muestras fue realizada en colaboración con tres centros especializados de Cochabamba.

Para la recolección óptima de los tejidos y preservar la integridad celular para una correcta extracción de ADN, en el presente estudio adaptamos las recomendaciones de (135), teniendo en cuenta las rutinas de trabajo de los centros colaboradores implicados, así como la contaminación natural de los tejidos intestinales. Estos procedimientos ayudaron a recolectar de manera óptima los tejidos y preservar su celular integridad para la extracción de ADN a pesar de su alta contaminación. Fue debido a esta contaminación que no se pudo aislar ningún parásito de ninguna de las muestras preparadas para crecer en medios NNN LIT.

Una vez obtenidas las muestras y debido a su naturaleza, se consideró necesario realizar un pretratamiento que consistió en rociar los tejidos con nitrógeno líquido. Este proceso permitió la pulverización de los tejidos, favoreciendo su fragmentación y homogeneización antes de proceder con la digestión enzimática utilizando proteinasa K. Este paso fue crucial para mejorar la solubilidad y la homogeneización de las capas mucosas contenidas en las muestras, lo que facilitó la extracción y purificación del ADN de los tejidos. El ADN obtenido demostró ser muy adecuado para la amplificación por qPCR, con la relación de A260/A280 mostrando un valor medio de $1,95 \pm 0,06$, indicando un buen rendimiento.

El equipo semiautomatizado y el kit comercial para la extracción de ADN utilizados en este estudio demostraron ser muy adecuados para la amplificación por qPCR, obteniendo extracciones limpias y de alta pureza. Los resultados del control endógeno RNasaP indicaron un buen rendimiento, lo que refleja la eficacia del proceso. Además, el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas se realizó cumpliendo con buenas prácticas en todas las etapas del procesamiento de las muestras.

Nuestros resultados respaldan la viabilidad de la amplificación del ADN parasitario cuando las muestras de tejido de colon se almacenan en etanol al 70% y a -80°C. Esta validación es particularmente valiosa, ya que el procesamiento de las muestras recolectadas de acuerdo con el protocolo establecido en este estudio permitiría analizar la presencia de *T. cruzi* en el tracto gastrointestinal, una aproximación que hasta ahora ha sido limitada debido a la falta de metodologías sólidas para detectar parásitos en esta localización (20).

Varios autores coinciden en el hecho de que los distintos resultados clínicos observados en la EC, incluida la afectación diferencial de los órganos diana, están influenciados por factores del hospedador y del patógeno, como por ejemplo los antecedentes genéticos (144) (145). Posiblemente la variabilidad genética del parásito puede ser uno de los principales moduladores de la expresión clínica de los pacientes que padecen EC.

En el trabajo realizado por Marcon y colaboradores, destinado a detectar y cuantificar *T. cruzi* en muestras de tejido cardíaco y gastrointestinal incluidas en parafina de pacientes crónicos, demostraron la presencia del parásito en los tejidos utilizando nested-PCR y Sybr Green-qPCR (146).

En otro estudio, se detectó presencia parasitaria en el 100% de los casos de enfermedad de Chagas con megaesófago (6/6) y en el 60% de los pacientes sin megaesófago (5/8), cuyas muestras de tejido fueron analizadas mediante qPCR dirigida al ADNk del parásito (147). De manera similar, Vago y sus colaboradores detectaron ADN de *T. cruzi* en muestras de tejido del 55% (5/9) de los pacientes con megaesófago, utilizando PCR dirigida al ADNk del parásito (148). Además, mostraron claramente, mediante el análisis de 13 muestras de tejido cardíaco y 4 de esófago, una firma genética de ADNk del parásito diferente en cada caso, lo que confirma observaciones previas sobre la gran variabilidad genética de *T. cruzi* (19).

La variabilidad de *T. cruzi* observada en los diferentes estudios no solo apunta a una enorme diversidad clonal, sino también a la posibilidad de que la mayoría de las cepas infectantes representen combinaciones de clones genéticamente distintos, lo que podría estar implicado en la determinación del desarrollo de las formas clínicas de la enfermedad (120).

Sin embargo, estudios previos de estandarización realizados con muestras de sangre humana han demostrado que el uso de ADNk puede generar una mayor proporción de resultados falsos positivos en comparación con el ADNsat (75). El ADNsat de *T. cruzi* está compuesto por aproximadamente 120,000 copias de una secuencia de 195 pb, que representa aproximadamente el 10% del ADN del parásito, lo que convierte a esta secuencia en una diana altamente sensible y ampliamente utilizada en diversos estudios (149).

En el presente trabajo, se empleó una técnica de PCR en tiempo real para la detección de ADNsat, utilizando un formato dúplex que combina la amplificación de una secuencia específica del satADN de *T. cruzi* y una secuencia del gen endógeno humano RNasa P, que actúa como control interno para garantizar la integridad y calidad del ADN extraído de las muestras clínicas (90). Este enfoque permitió confirmar que las muestras analizadas contenían ADN de alta calidad, lo cual es esencial para garantizar resultados confiables en las pruebas de amplificación por métodos moleculares.

Para la detección específica de *T. cruzi*, se seleccionó un fragmento de 166 pb perteneciente a las repeticiones satélite del ADN del genoma nuclear del parásito. Este fragmento es altamente conservado entre las cepas de *T. cruzi*, lo que lo convierte en una diana ideal para la identificación del parásito en diversas muestras biológicas, como las de sangre y tejido. La aplicación de esta diana mediante la técnica de qPCR permitió determinar la parasitemia activa en los pacientes incluidos en el estudio, proporcionando una medida precisa de la carga parasitaria en cada caso de pacientes con EC crónico.

Los resultados obtenidos a partir de las muestras de sangre mostraron una tasa de positividad del 59,5%, lo que indica la presencia de *T. cruzi* en una proporción significativa de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica. Esta sensibilidad detectada se encuentra dentro del rango reportado en la literatura, que varía entre un 45% y un 60% en pacientes con EC crónica, especialmente cuando se analizan muestras de sangre periférica (150). La capacidad de esta técnica para detectar la parasitemia en sangre es de gran relevancia clínica, ya que ofrece una herramienta eficiente y precisa para el diagnóstico y monitoreo de la EC en fases crónicas, cuando la carga parasitaria en sangre puede ser baja y difícil de detectar por métodos convencionales.

La sensibilidad obtenida en el caso de las muestras de tejido fue inferior al 50%, utilizando la misma metodología empleada para las muestras de sangre, lo que indica que la capacidad de detección en los tejidos es considerablemente más baja. Sin embargo, estos resultados, obtenidos de pacientes afectados por daño digestivo o por la forma digestiva de la EC, respaldan la hipótesis de la persistencia a largo plazo de *T. cruzi* en el tracto digestivo, especialmente en la fase crónica de la infección. Estos hallazgos confirman, en pacientes humanos, los resultados previamente observados en modelos experimentales animales (murinos), como los descritos por Lewis y colaboradores (151).

Según el modelo de Lewis y su equipo, el tracto gastrointestinal, y en particular el colon y el estómago, representan los sitios principales de persistencia del parásito a largo plazo, como se demostró en ratones infectados (152). En mi trabajo de tesis, las muestras de tejido obtenidas procedían de tres segmentos diferentes del colon: el extremo proximal ascendente, el extremo central transversal y el extremo distal descendente. A partir de estas muestras, se extrajo ADN y, mediante qPCR, fue posible detectar el ADNsat de *T. cruzi* en los tres sitios. Sin embargo, la positividad varió de manera heterogénea entre las muestras, lo que sugiere una distribución no uniforme del parásito en el tracto digestivo de los pacientes, dentro del grupo de pacientes estudiados.

En las muestras analizadas, además, se realizó la cuantificación de la carga parasitaria utilizando una curva estándar generada a partir de ADNsat sintético, aplicada tanto a muestras de sangre como de tejido. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que la técnica de qPCR se emplea para cuantificar la carga parasitaria en tejidos digestivos humanos. Para ello, se utilizó una curva estándar construida con una molécula sintética de ADNsat, que se incrustó en el ADN total de tejidos digestivos no infectados como matriz, lo que representa una aproximación innovadora en el análisis de muestras biológicas infectadas. Esta estrategia simuló las condiciones de las muestras clínicas analizadas, lo que representa una innovación metodológica en la cuantificación precisa de ADN de *T. cruzi* en tejidos de megacolon.

El uso de una secuencia sintética de ADNsat, que es altamente conservada entre las distintas cepas de *T. cruzi*, como estándar para la cuantificación de la carga parasitaria, permite una medición más precisa de los parásitos, independientemente de la unidad de tipificación discreta (UDT) a la que pertenezcan. Esto es particularmente valioso, ya que facilita la compa-

ración directa de las cargas parasitarias obtenidas mediante qPCR en muestras infectadas, incluso cuando estas corresponden a diferentes UDTs. Este enfoque ha sido previamente respaldado por estudios como el de Muñoz-Calderón y colaboradores (137), quienes también acentúan las ventajas de utilizar secuencias conservadas como herramienta de cuantificación precisa utilizando métodos moleculares.

En nuestros resultados, las muestras de tejido positivas para *T. cruzi* mostraron una variabilidad notable en las cargas parasitarias, que oscilaron entre $6,34E+02$ copias de ADNsat Eq.tejido/mg en la muestra con la carga más baja y $1,45E+07$ copias de ADNsat Eq.tejido/mg en la muestra con la carga más alta. En comparación, las cargas obtenidas en las muestras de sangre fueron considerablemente más bajas, variando entre $5,87E+01$ y $9,93E+03$ copias de ADNsat/ μ l. Esta diferencia en las cargas parasitarias entre las muestras de tejido y sangre es consistente con lo que se ha observado en estudios previos, donde la parasitemia en sangre puede ser más difícil de detectar, especialmente en fases crónicas de la EC.

La variabilidad observada entre las muestras podría explicarse por varios factores, entre ellos la diversidad en la extensión de la afectación digestiva de los pacientes. En particular, el grado de daño en los tejidos digestivos, como el megacolon o el megaesófago, podría influir en la concentración de parásitos presentes en las muestras de tejido. Además, las diferencias en las cargas parasitarias pueden estar relacionadas con el diagnóstico clínico observado en los pacientes, ya que aquellos con formas más graves de la enfermedad, o con daño tisular avanzado, podrían tener una mayor carga parasitaria en los tejidos afectados. Esta variabilidad resalta la complejidad de la EC y la necesidad de metodologías sensibles y específicas para evaluar la carga parasitaria en diferentes tipos de muestras biológicas, lo que a su vez podría mejorar el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes en etapas crónicas.

Las técnicas de PCR son ampliamente reconocidas por su alta sensibilidad y especificidad, lo que las convierte en herramientas fundamentales para la detección molecular de patógenos. Sin embargo, para que estos métodos sean efectivos, es crucial que se encuentren adecuadamente estandarizados y validados en cada laboratorio, adaptándose a los diferentes tipos de muestras que se vayan a analizar y considerando las limitaciones de recursos disponibles. En este contexto, el presente estudio se llevó a cabo en colaboración con tres centros especializados en los que se recolectaron las muestras biológicas de los pacientes. Gracias a

esta coordinación, se logró la recolección y conservación óptima de las muestras, lo que garantizó su calidad para el análisis posterior mediante pruebas moleculares, asegurando resultados confiables y reproducibles.

La diversidad de cepas de *T. cruzi*, así como la multiplicidad de sus genotipos y fenotipos, ha sido reconocida desde hace tiempo como uno de los factores más complejos y fundamentales en la biología del parásito. Esta diversidad, junto con la complejidad ecoepidemiológica de la enfermedad de Chagas, influye de manera determinante en el comportamiento del parásito, su transmisión y, particularmente, en el desarrollo diferencial de los distintos cuadros clínicos de la enfermedad (113) (117) (131).

En este contexto, resulta de suma importancia disponer de herramientas diagnósticas que permitan una tipificación precisa de las cepas de *T. cruzi*, para poder avanzar en el entendimiento de las relaciones entre la variabilidad genética del parásito y la heterogeneidad clínica observada en los pacientes. La capacidad de identificar y caracterizar los diferentes genotipos de *T. cruzi* no solo contribuiría a un diagnóstico más preciso, sino que también proporcionaría información clave para el diseño de estrategias de tratamiento y control más efectivas, adaptadas a las características genéticas de las cepas prevalentes en cada región. Este conocimiento detallado sobre la diversidad genotípica del parásito es crucial para abordar la complejidad de la EC y su impacto a nivel global.

En la mayoría de los estudios sobre *T. cruzi*, el genotipado de las poblaciones del parásito se ha realizado generalmente después del aislamiento y amplificación de los parásitos en cultivo, utilizando esquemas de PCR dirigidos a un conjunto de marcadores moleculares específicos para las distintas cepas (117). Sin embargo, este enfoque presenta ciertas limitaciones y desventajas, que han sido discutidas por varios investigadores (153) (154). Uno de los principales inconvenientes de este enfoque es el proceso de aislamiento de los parásitos, que puede llevar a la selección de subpoblaciones más adaptadas para crecer en medios axénicos, lo cual no refleja necesariamente la diversidad genética de la población original presente en el huésped. Es decir, las subpoblaciones seleccionadas para el cultivo podrían no ser representativas de la diversidad de cepas presentes en el paciente, lo que limita la capacidad de identificar toda la heterogeneidad genética del parásito.

Además, los métodos de genotipado basados en PCR tienen una sensibilidad limitada, ya que suelen identificar el genotipo predominante en la muestra y tienden a excluir la posible multiclonalidad de las infecciones por *T. cruzi*, que es un fenómeno común, especialmente en infecciones crónicas o mixtas. Esta limitación implica que algunas cepas minoritarias, que pueden estar presentes en menores cantidades, pueden pasar desapercibidas en el análisis, lo que lleva a una subestimación de la diversidad genética real del parásito. Por lo tanto, el desarrollo de métodos más sensibles para caracterizar las subpoblaciones parasitarias sería crucial para obtener una visión más precisa y completa de la realidad de las infecciones por *T. cruzi*. (117).

Un aspecto fundamental a resaltar es la realidad de que, en áreas altamente endémicas como Bolivia, los habitantes pueden estar expuestos de manera recurrente a múltiples infecciones por *T. cruzi*, debido al contacto repetido con los vectores triatomínicos infectados. Éstos, pueden haberse alimentado de varios huéspedes humanos y reservorios mamíferos, lo que aumenta la probabilidad de que las personas se infecten con diferentes cepas del parásito. Este fenómeno, conocido como infección mixta, procura que el mismo individuo albergue en su organismo distintas poblaciones de *T. cruzi*, lo que resulta en una combinación de genotipos y fenotipos del parásito que pueden ser diferentes entre sí. Esta multiclonalidad en las infecciones, que es común en zonas endémicas, refleja la compleja interacción entre el parásito, sus vectores y los reservorios, y es una característica importante que debe tenerse en cuenta tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de la enfermedad. Por un lado, la identificación y caracterización de las diferentes cepas de *T. cruzi* en un mismo paciente puede ser más compleja debido a la coexistencia de varias poblaciones parasitarias.

Para el genotipado de las muestras analizadas en el presente estudio, se estableció como criterio de inclusión un resultado positivo en qPCR, basado en la detección del ADNsat nuclear de *T. cruzi* (77), con un umbral de ciclo (Ct) ≤ 33 . Este umbral de Ct se eligió como un parámetro para asegurar una amplificación suficiente del material genético, lo que indica una carga parasitaria adecuada en las muestras, lo cual es crucial para una posterior tipificación genética confiable. En cuanto a las estrategias moleculares de tipificación de *T. cruzi*, existen diversas metodologías bien documentadas, pero en este trabajo se optó por el modelo propuesto por Burgos y colaboradores (122) (126), que utiliza un diagrama de flujo de PCR convencional basado en los marcadores moleculares SL-IR, el gen del ADN ribosómico 24S α y el A10, que son secuencias altamente conservadas en *T. cruzi*. Estos marcadores han demostrado ser efectivos en la identificación y caracterización de las unidades de tipificación discreta (UDTs) del parásito.

Otra variable en la elección de este enfoque se debió a que estos métodos son los que se emplean en el LaBMECh (Laboratorio de Biología Molecular y Epidemiología Chagas) del INGEI-CONICET en Buenos Aires, Argentina, dirigido por el Dr. Alejandro Gabriel Schijman, quien es uno de los principales expertos en el campo y colaboró en el trabajo de laboratorio realizado en el presente estudio. La experiencia del Dr. Schijman y su equipo en el análisis molecular de *T. cruzi* fue fundamental para garantizar la calidad y precisión de los procedimientos empleados, además de asegurar que los resultados obtenidos se alinearan con los estándares internacionales de tipificación genética del parásito.

El enfoque basado en el diagrama de flujo de PCR convencional requiere la realización de múltiples reacciones de PCR a punto final secuenciales, lo que hace que el proceso sea más laborioso y demandante en términos de tiempo y recursos. Sin embargo, esta metodología ofrece ventajas importantes, ya que permite la identificación precisa de los genotipos de *T. cruzi* directamente a partir de muestras clínicas, incluso cuando estas contienen una carga parasitaria baja, (118) como fue el caso en nuestro estudio. Esta ventaja es especialmente relevante en contextos clínicos de cronicidad donde la carga parasitaria suele ser baja.

Sin embargo, en lo que respecta a la detección y tipificación de *T. cruzi* en el tejido intestinal humano, los datos disponibles son limitados. En la fase crónica de la enfermedad, aunque las formas amastigotes de *T. cruzi* con capacidad de replicación, se encuentran presentes en los tejidos, las biopsias intestinales son muestras de difícil acceso y su obtención es altamente invasiva (134) (155). Es relevante destacar que, aunque existe una considerable diversidad genética dentro de las unidades de tipificación discreta (UDT) de *T. cruzi*, en la mayoría de los estudios el genotipado se realiza a nivel de linaje, lo que limita la capacidad de identificar las subpoblaciones genéticas más específicas y diversas del parásito (113).

La determinación de los principales linajes o unidades de tipificación discreta (UDTs) de *T. cruzi* que se han reportado en infecciones humanas incluyen TcI, TcII, TcV y TcVI. Diversos estudios realizados en distintas regiones sugieren que cualquiera de estos linajes puede estar asociado con el desarrollo de la enfermedad de Chagas. En un estudio realizado por Parrado y colaboradores, se identificaron diferentes UDTs en 31 muestras de sangre periférica de pacientes provenientes de diversas regiones de Bolivia, como Cochabamba, Tarija y Aiquile. En 23 de estos pacientes, se identificaron las UDTs TcII/V/VI, mientras que en seis

pacientes se detectó solo la UDT TcI, y en dos pacientes se observó una infección mixta con TcI y TcII/V/VI (156).

En comparación con los resultados obtenidos por Parrado y colaboradores, en nuestro grupo de pacientes no se logró identificar el UDT TcI. Sin embargo, en nuestro análisis, sí conseguimos identificar las unidades de tipificación discreta (UDTs) TcII, TcV y TcVI en muestras de sangre periférica de los pacientes estudiados. Estos hallazgos refuerzan la presencia y circulación de estos linajes en pacientes bolivianos que padecen la forma crónica digestiva de la EC, sugiriendo que UDTs como TcII/V/VI pueden ser los principales implicados en la evolución de la enfermedad en nuestra población. Estos resultados también son consistentes con otros estudios previos que han documentado la prevalencia de estos linajes en diferentes regiones endémicas de Bolivia, lo que pone de manifiesto su relevancia en la epidemiología de la EC en el país. (156).

En un estudio previo realizado por Virreira y colaboradores, se tipificaron muestras de tejido digestivo de 18 pacientes bolivianos con megacolon chagásico, utilizando sondas específicas para la detección de ADNk de los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI. Los resultados mostraron que la mayoría de las muestras analizadas correspondían al linaje TcV, identificado en 16 de los 18 pacientes (157). En nuestro estudio, realizado con un grupo de pacientes diagnosticados con EC crónica, se logró identificar los linajes TcII y TcV en las muestras de tejido digestivo. Estos resultados coinciden en parte con los de Virreira (157), pero también reflejan la diversidad de los linajes presentes, ya que en nuestro caso no se detectó el linaje TcI, lo que podría indicar variaciones geográficas o clínicas en las poblaciones estudiadas. En diversos estudios, se ha observado una circulación similar de estos linajes en diversas regiones endémicas de Sudamérica, lo que sugiere que tanto TcII como TcV son prevalentes no solo en Bolivia, sino también en países vecinos como Argentina, Brasil y Paraguay.

El linaje TcIII rara vez se asocia con infecciones humanas, y la mayoría de los casos reportados han sido en la región amazónica, generalmente vinculados a brotes agudos (113). Por otro lado, el linaje TcIV ha sido identificado como responsable de brotes agudos de la enfermedad de Chagas transmitidos por vía oral en diversas zonas de Brasil, (Canudos, Belém y el estado de Pará) (158). En nuestro estudio, sin embargo, no se detectaron ni el linaje TcIII ni el TcIV, lo que resalta las diferencias geográficas y epidemiológicas en la circulación de los linajes de *T. cruzi*.

La información disponible de diversos estudios sugiere que los linajes (UDTs) de *T. cruzi* detectados en humanos, más allá de su presentación clínica, proporcionan una visión importante de los principales UDTs que circulan en los ciclos de transmisión doméstica en una región determinada (141).

También se debe señalar que debido a los tropismos de cepa diferencial, los parásitos del torrente sanguíneo no son necesariamente el mismo genotipo responsable de la patología que presentan los pacientes con EC crónico.(159).

A diferencia de los estudios previos, nuestro trabajo abarca una cohorte más amplia de pacientes crónicos con EC y manifestaciones de megasíndrome digestivo. Este enfoque nos permitió no solo detectar y cuantificar la carga parasitaria, sino también identificar los linajes (UDTs) de *T. cruzi* en sangre y en diferentes segmentos del tracto digestivo, directamente a partir de muestras clínicas. Este procedimiento se realizó sin necesidad de aislar previamente el parásito para la extracción de ADN, lo cual resulta crucial para identificar infecciones mixtas, ya que evita la posible selección de cepas durante el proceso de aislamiento. Nuestro estudio, ha logrado identificar infecciones por los linajes TcII, TcV y TcVI en muestras de sangre, y los linajes TcII y TcV en muestras de tejido. Es importante señalar que no se observó una asociación directa entre algún linaje en particular y las manifestaciones clínicas, lo que sugiere que existe una variabilidad genética heterogénea entre los genotipos presentes en los pacientes con afección digestiva.

Limitaciones del estudio:

En Bolivia, las complicaciones digestivas de la enfermedad de Chagas (EC) se diagnostican y tratan en todos los hospitales del país, lo que genera una amplia dispersión de pacientes en diversos centros del Sistema de Salud. Esta distribución geográfica hace difícil reclutar un número significativo de pacientes para los estudios, ya que implicaría contar con personal trabajando simultáneamente en varios centros. Sin embargo, debido a limitaciones económicas, no ha sido posible implementar este enfoque a gran escala.

A pesar de las limitaciones mencionadas, este estudio representa la serie más amplia de pacientes con megacolon analizada hasta la fecha. Aun así, el tamaño de la muestra y los resultados obtenidos limitan las observaciones en cuanto a la distribución y papel de las diversas DTUs en las complicaciones digestivas de la EC.

Además, debido a los mismos factores antes mencionados, otra limitación importante ha sido el decalaje horario entre la toma de las muestras y su procesamiento y transporte, debido a la falta de personal. Por este mismo motivo, ha habido una falta de recogida de muestras en 5 pacientes (tres pacientes sin muestras de sangre y dos pacientes sin muestras de tejido).

Proyección a futuro:

El presente estudio de genotipado de *T. cruzi* ha proporcionado avances importantes en cuanto a la metodología utilizada y un mejor conocimiento sobre la ecoepidemiología y la patogenicidad del parásito en pacientes con enfermedad de Chagas crónico y afectación de la forma digestiva en el departamento de Cochabamba, Bolivia.

Las proyecciones a futuro serían utilizar esta misma metodología en otras áreas de Bolivia y en otros países latinoamericanos con una problemática similar, para poder dibujar con más precisión la ecoepidemiología de las complicaciones digestivas de la EC.

Otra línea de trabajo es la de profundizar en la interacción hospedador-parásito, para entender mejor la fisiopatología de la enfermedad e intentar visibilizar posibles mejoras en cuanto a diagnóstico precoz de la afectación digestiva.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. La pulverización pretratamiento con nitrógeno líquido antes de la digestión con proteina K fue muy relevante para favorecer la solubilidad y la homogeneización de las capas mucosas y extraer fácilmente el ácido desoxirribonucleico de los tejidos. Ello contribuyó a reducir el tiempo del procedimiento y a facilitar su reproducibilidad.
2. Esta es la primera vez que la carga parasitaria en tejido digestivo se ha abordado mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y cuantitativa (qPCR), empleando una curva estándar hecha de una molécula sintética de ácido desoxirribonucleico sat integrada en ácido desoxirribonucleico total de tejido digestivo no infectado como matriz.
3. La prueba de amplificación molecular a partir de una sola muestra de tejido disminuyó la posibilidad de diagnosticar *Trypanosoma cruzi* en un paciente infectado. En consecuencia, se recomienda tomar muestras de diferentes sitios del tejido para mejorar la sensibilidad y la generación de datos más precisos sobre la presencia de *Trypanosoma cruzi* en los tejidos.
4. El uso de una secuencia sintética de ácido desoxirribonucleico sat altamente conservada como estándar permite una cuantificación más precisa de los parásitos, sea cuál sea su unidad discreta de tipificación, lo que permite una comparación directa de las cargas de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa en muestras infectadas con diferentes unidades discretas de tipificación.
5. La estimación de la carga parasitaria de muestras positivas por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa en sangre fue mayor en comparación a las muestras de tejido.
6. Se ha caracterizado la presencia de las unidades discretas de tipificación TcII, TcV, en muestras de sangre y de tejido digestivo de pacientes bolivianos chagásicos crónicos con megacolon.
7. La unidad discreta de tipificación TcVI sólo ha sido identificada en muestras de sangre de estos mismos pacientes,
8. La identificación de los linajes parasitarios de *Trypanosoma cruzi* directamente de muestras clínicas revela un predominio de TcII/V tanto en sangre como en tejido de pacientes bolivianos con Chagas crónico y con afección de megacolon.

9. El presente estudio utilizando la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativa respalda los resultados obtenidos previamente por otros autores, y proporciona más evidencia de la relevancia del tracto digestivo en la persistencia del parásito, reforzando la idea de centrarse en mejorar la comprensión de la interacción hospedador-patógeno en el tejido digestivo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

III. BIBLIOGRAFÍA

1. Dorn PL, Monroy C, Curtis A. *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): a review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. *Infect Genet Evol.* 2007;7(2):343–52.
2. De Fuentes-Vicente JA, Santos-Hernández NG, Ruiz-Castillejos C, Espinoza-Medini-lla EE, Flores-Villegas AL, de Alba-Alvarado M, et al. What do you need to know before studying Chagas disease? A beginner's guide. *Trop Med Infect Dis.* 2023 Jul 1;8(7).
3. Organización Mundial de la Salud. La financiación de los sistemas de salud. [Internet]. 2022 Nov 13 [cited 2022 Nov 13]. Available from: <http://edeltripp.daportfolio.com>
4. Kropf SP, Sá MR. The discovery of *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease (1908-1909): tropical medicine in Brazil. *Hist Cienc Saude Manguinhos.* 2009;16 Suppl 1(SUPPL. 1):13–34.
5. Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104 Suppl 1(SUPPL. 1):31–40.
6. Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008 Aug;2(9).
7. World Health Organization (WHO). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) [Internet]. 2021 [cited 2022 Mar 4]. Available from: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
8. Gascon J, Pinazo MJ. Control de la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en España: principal reto de la patología importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2008 [cited 2024 Nov 9];26(10):607-8. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-pdf-S0213005X08752753>
9. Pinazo MJ, Gascon J. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop.* 2015 Apr 8;151(1):16–20.
10. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1–2).

11. Organización Panamericana de la Salud (OPS/OMS). Enfermedad de Chagas. 2020 [cited 2024 Jun 10]. Available from: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
12. De Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*. 2010 May 1;201(9):1308–15.
13. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA*. 2007 Nov 14;298(18):2171–81.
14. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on Leishmania: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009 Oct;136(12):1509–28.
15. Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010 Apr 17;375(9723):1388–402.
16. Coura C.I., Schijman AG. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Rev Esp Salud Pública*. 2013. Available from: Redalyc. Enhanced Reader.
17. Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*. 1992;5(4):400–19.
18. Bern C. Chagas' Disease. Longo DL, editor. *N Engl J Med*. 2015 Jul 30;373(5):456–66.
19. Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today*. 1998;14(3):119–24.
20. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. 2001;1:33–7.
21. Carrada-Bravo T. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin*. 2004;51(4):205–19.
22. Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Oct;3(10):819–23.
23. Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Molestia de Carlos Chagas”: (Esquizotripanoze humana ou tireoidite parasitária). *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911;3(2):276–94.

24. Bellotti G, Bocchi EA, De Moraes AV, De Higuchi ML, Barbero-Marcial M, Sosa E, et al. In vivo detection of *Trypanosoma cruzi* antigens in hearts of patients with chronic Chagas' heart disease. *Am Heart J*. 1996;131(2):301–7.
25. Higuchi M de L, De Brito T, Martins Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*. 1993;2(2):101–6.
26. Bilate AMB, Cunha-Neto E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008 Apr;50(2):67–74.
27. Bustamante JM, Rivarola HW, Palma JA, Paglini-Oliva PA. Electrocardiographic characterization in *Trypanosoma cruzi* reinfected mice. *Parasitology*. 2004 Apr;128(Pt 4):415–9.
28. Lo Presti MS, Esteves BH, Moya D, Bazán PC, Strauss M, Báez AL, et al. Circulating *Trypanosoma cruzi* populations differ from those found in the tissues of the same host during acute experimental infection. *Acta Trop*. 2014 May 1;133(1):98–109.
29. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*. 2019;7(6).
30. Peña-Callejas G, González J, Jiménez-Cortés JG, Fuentes-Vicente JA de, Salazar-Schettino PM, Bucio-Torres MI, et al. Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de *Trypanosoma cruzi*. *TIP Rev Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 2022 Jun 18;25:1–19.
31. de Sousa DRT, de Oliveira Guerra JA, Ortiz JV, do Nascimento Couceiro K, da Silva e Silva MRH, Jorge Brandão AR, et al. Acute Chagas disease associated with ingestion of contaminated food in Brazilian western Amazon. *Trop Med Int Health*. 2023 Jul 1;28(7):541–50.
32. Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes C, Rassi A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2010 Apr [cited 2024 Nov 8];23(2):324–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20375355/>
33. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2016 Feb 1;34(2):132–8.

34. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):277–82.
35. Medrano-Mercado N, Ugarte-Fernandez R, Butrón V, Uber-Busek S, Guerra HL, De Araújo-Jorge TC, et al. Urban transmission of Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(5):423–30.
36. Sangenis LHC, Saraiva RM, Georg I, de Castro L, dos Santos Lima V, Roque ALR, et al. Autochthonous transmission of Chagas disease in Rio de Janeiro State, Brazil: a clinical and eco-epidemiological study. *BMC Infect Dis.* 2015 Jan 8;15(1).
37. Reyes M, Torres Á, Esteban L, Flórez VM. Riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas por intrusión de triatomíneos y mamíferos silvestres en Bucaramanga, Santander, Colombia. *Biomédica.* 2017;37(1). Available from: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=84349833010>
38. Zaidel EJ, Forsyth CJ, Novick G, Marcus R, Luiz A, Ribeiro P, et al. COVID-19: Implications for people with Chagas disease. 2020.
39. Abad-Franch F, Vega MC, Rolón MS, Santos WS, de Arias AR. Community participation in Chagas disease vector surveillance: systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jun;5(6).
40. Torrico F, Gascón J, Barreira F, Blum B, Almeida IC, Alonso-Vega C, et al. New regimens of benzimidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 2021 Aug 1;21(8):1129–40.
41. Norman G, Sherbino J, Dore K, Wood T, Young M, Gaissmaier W, et al. The etiology of diagnostic errors: a controlled trial of system 1 versus system 2 reasoning. *Acad Med.* 2014;89(2):277–84.
42. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico M-C, Dramaix M, Truyens C. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Feb;70(2):201-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14993634/>
43. Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, et al. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci.* 2004 Sep 1;117(Pt 19):4411–22.

44. Brutus L, Schneider D, Postigo J, Delgado W, Mollinedo S, Chippaux JP. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007 Nov;101(11):1159–60.
45. Cortez MR, Pinho AP, Cuervo P, Alfaro F, Solano M, Xavier SCC, et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida Trypanosomatidae): ecology of the transmission cycle in the wild environment of the Andean valley of Cochabamba, Bolivia. *Exp Parasitol.* 2006 Dec;114(4):305–13.
46. Carlier MF, Pernier J, Montaville P, Shekhar S, Kühn S. Control of polarized assembly of actin filaments in cell motility. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Aug 25;72(16):3051–67.
47. Kemmerling U, Osuna A, Schijman AG, Truyens C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A review about the interactions between the parasite, the placenta, the maternal and the fetal/neonatal immune responses. *Front Microbiol.* 2019;10(AUG).
48. Bern C, Verastegui M, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis.* 2009 Dec;49(11):1667.
49. Brutus L, Castillo H, Bernal C, Salas NA, Schneider D, Santalla JA, et al. Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg.* 2010 Nov;83(5):1044.
50. Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jun 11;65(8):1759–64.
51. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T. Where do *Trypanosoma cruzi* go? The distribution of parasites in blood components from fractionated infected whole blood. *Transfusion (Paris).* 2016 Sep 1;56(9):2233–8.
52. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus.* 2015 Oct 1;13(4):540–50.
53. Smith M, Dominguez-Gil B, Greer DM, Manara AR, Souter MJ. Organ donation after circulatory death: current status and future potential. *Intensive Care Med.* 2019 Mar 13;45(3):310–21.
54. Hidron A, Vogenthaler N, Santos-Preciado JI, Rodriguez-Morales AJ, Franco-Paredes C, Rassi A. Cardiac involvement with parasitic infections. *Clin Microbiol Rev.* 2010 Apr;23(2):324–49.

55. Robertson LJ, Devleesschauwer B, Alarcón de Noya B, Noya González O, Torgerson PR. *Trypanosoma cruzi*: Time for international recognition as a foodborne parasite. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jun 2;10(6)
56. de Noya BA, González ON. An ecological overview on the factors that drive *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop*. 2015 Mar 2;151(1):94–102.
57. Añez N, Crisante G, Romero M. Supervivencia e infectividad de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* en alimentos experimentalmente contaminados. *Bol Malariol Salud Ambient*. 2009;49(1):91–6.
58. Suzuki AF, de Souza ER, Spadella MA, Chagas EFB, Hataka A, Martins LPA. Oral infection and survival of *Trypanosoma cruzi* in sugarcane juice conditioned at different temperatures. *Acta Parasitol*. 2024 Mar 1;69(1):251–9.
59. de Sousa DRT, de Oliveira Guerra JA, Ortiz JV, do Nascimento Couceiro K, da Silva e Silva MRH, Jorge Brandão AR, et al. Acute Chagas disease associated with ingestion of contaminated food in Brazilian western Amazon. *Trop Med Int Health* [Internet]. 2023 Jul 1 [cited 2024 Nov 8];28(7):541–50. Available from: <https://novaresearch.unl.pt/en/publications/acute-chagas-disease-associated-with-ingestion-of-contaminated-fo>
60. Alarcón de Noya B, Colmenares C, Díaz-Bello Z, Ruiz-Guevara R, Medina K, Muñoz-Calderón A, et al. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiol Control*. 2016 Jun 1;1(2):188–98.
61. Beatty NL, Arango-Ferreira C, Gual-Gonzalez L, Zuluaga S, Nolan MS, Cantillo-Barraza O. Oral Chagas disease in Colombia—Confirmed and suspected routes of transmission. *Trop Med Infect Dis*. 2024 Jan 1;9(1).
62. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas disease diagnostic applications: Present knowledge and future steps. *Adv Parasitol*. 2017;97:1–45.
63. Alonso-Padilla J, Gallego M, Schijman AG, Gascon J. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev Mol Diagn*. 2017 Jul 3;17(7):699–710.
64. Torrico F, Vega CA, Suarez E, Tellez T, Brutus L, Rodriguez P, et al. Are maternal re-infections with *Trypanosoma cruzi* associated with higher morbidity and mortality of congenital Chagas disease? *Trop Med Int Health*. 2006 May 1;11(5):628–35.
65. Longhi SA, Schijman AG. ¿Cómo se diagnostica la enfermedad de Chagas? *Ciencia e Investigación*. 2022;TOMO 72 No:40.

66. Dias JAMNARGMM de OCP. *Diagnóstico laboratorial da infecção pelo Trypanosoma cruzi*. 2nd ed. 2023 [cited 2024 Nov 9]. p. Chapter 17 (PDF). Available from: https://www.researchgate.net/publication/270648178_Diagnostico_laboratorial_da_infeccao_pelo_Trypanosoma_cruzi
67. Freilij H, Biancardi M, Lapeña A, Ballering G, Moscatelli JA. La enfermedad de Chagas en la edad pediátrica. *Enf Emerg*. 2007;Supl 1:17–21.
68. Mora MC, Sanchez Negrette O, Marco D, Barrio A, Ciaccio MAS, MAB. Early Diagnosis of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection Using PCR, Hemoculture, and Capillary Concentration, as Compared with Delayed Serology. *J Parasitol*. 2005 [cited 2024 Nov 9];91(6):1468–1473. Available from: <https://www.jstor.org/stable/20059896>
69. Cobo EDC, Silveira TP, Micheletti AM, Crema E, Adad SJ. Research on *Trypanosoma cruzi* and analysis of inflammatory infiltrate in esophagus and colon from chronic chagasic patients with and without mega. *J Trop Med*. 2012.
70. Olivera MJ, Cucunubá ZM, Álvarez CA, Nicholls RS. Safety Profile of Nifurtimox and Treatment Interruption for Chronic Chagas Disease in Colombian Adults. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Dec 9;93(6):1224–30.
71. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27(7):1477–82.
72. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989 Mar 15;33(3):205–14.
73. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, et al. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68(5):574–82.
74. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1).
75. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(1).

76. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SDJ, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol.* 2005 Apr 1;35(4):411–7.
77. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 2007;103(3):195–200.
78. Bisio MMC, Rivero R, Gonzalez N, Ballering G, D’Amico I, Kessler C, et al. Diagnostic accuracy of two molecular tools for diagnosis of congenital Chagas disease. *Mol Diagn Ther.* 2021 Nov 1;25(6):791–801.
79. Lopez Albizu MC, Rivero R, Ballering GE, Freilij HL, Santini MS, Bisio MMC. Laboratory diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: a narrative review. *Front Parasitol.* 2023 May 24;2.
80. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2018 Aug 1;184:59–66.
81. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):150–4.
82. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):63.
83. Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz Mata I, Picado de Puig A, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Jul 20;11(7)
84. Besuschio SA, Picado A, Muñoz-Calderón A, Wehrendt DP, Fernández M, Benatarid A, et al. *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Aug 1;14(8)
85. Rojas Panozo L, Rivera Nina S, Wehrendt DP, Casellas A, Pinto L, Mendez S, et al. Evaluation and validation of a PrintrLab-based LAMP assay to identify *Trypanosoma cruzi* in newborns in Bolivia: a proof-of-concept study. *Lancet Microbe.* 2024 Sep 1;5(9)–e565.
86. Brasil PEAA, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: Systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2010 Nov 25;10(1):1–17.

87. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, et al. Chagas Cardiomyopathy: Usefulness of EKG and Echocardiogram in a Non-Endemic Country. *PLoS One*. 2016 Jun 1;11(6)
88. Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, et al. Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? *J Clin Microbiol*. 2016 Jun 1;54(6):1566–72.
89. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129(1):53–9.
90. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4)
91. Ferrer E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bio-medicina*. 2015;27:359–71.
92. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;48(2):211–21.
93. Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, et al. *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*. 2012 Apr;139(4):516–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22309735/>
94. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23350002/>
95. Ramírez JC, Cura CI, Da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*. 2015;17(5):605–15.
96. Elias MCQB, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129(1):35–42.
97. Elias MCQB, Vargas N, Tomazi L, Pedroso A, Zingales B, Schenkman S, et al. Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL

- Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that correspond to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Mol Biochem Parasitol.* 2005;140(2):221–7.
98. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010 May 1;28(5):284–93.
 99. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, et al. Identification of a Western Blot Pattern for the Specific Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection in Human Sera. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Mar;86(3):412–5.
 100. Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion (Paris).* 2003 Jan 1;43(1):91–7.
 101. Mucci J, Carmona SJ, Volcovich R, Altcheh J, Bracamonte E, Marco JD, et al. Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Oct 9;11(10)
 102. Del-Rei RP, Leony LM, Celedon PAF, Zanchin NIT, dos Reis MG, de Miranda Gomes Y, et al. Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease individuals from endemic South American countries. *PLoS One.* 2019 Apr 1;14(4)
 103. Abras A, Ballart C, Fernández-Arévalo A, Pinazo MJ, Gascón J, Muñoz C, et al. Worldwide Control and Management of Chagas Disease in a New Era of Globalization: a Close Look at Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2022 Apr 1;35(2)
 104. Egüez KE, Alonso-Padilla J, Terán C, Chipana Z, García W, Torrico F, et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Apr 3;11(4)
 105. Mendicino D, Colussi C, Stafuza M, Manattini S, Montemaggiore S, Nepote M. Seroprevalencia de Chagas en mayores de 14 años de áreas rurales del Chaco Santafesino. *Rev Fac Cienc Med Cordoba.* 2019 Feb 27;76(1):47–51.
 106. Lozano D, Rojas L, Méndez S, Casellas A, Sanz S, Ortiz L, et al. Use of rapid diagnostic tests (RDTs) for conclusive diagnosis of chronic Chagas disease – field implementation in the Bolivian Chaco region. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Dec 19;13(12).
 107. Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop.* 2010 Jul;115(1–2):55–68.

108. Torrico F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-Vega C, Pinazo MJ, Schijman A, et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018 Apr 1;18(4):419–30.
109. Gaunt MW, Yeo M, Frame JA, Stothard JR, Carrasco HJ, Taylor MC, et al. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 2003 Feb 27;421(6926):936–9.
110. Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol*. 2001;31(11):1218–26.
111. De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, et al. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006 Mar;2(3):0226–35.
112. Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003 Oct 28;2:12.
113. Zingales B, Macedo AM. Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? *Life (Basel)*. 2023 Dec 1;13(12):1945–52.
114. Arnaud-Haond S, Moalic Y, Barnabé C, Ayala FJ, Tibayrenc M. Discriminating micro-pathogen lineages and their reticulate evolution through graph theory-based network analysis: the case of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8).
115. 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(7):1051–4.
116. Marcili A, Valente VC, Valente SA, Junqueira ACV, Silva FM da, Pinto AY das N, et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TCI and TCIIa in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. *Int J Parasitol*. 2009 Apr 1;39(5):615–23.
117. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):240–53.
118. Guhl F, Ramírez JD. *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop*. 2011 Jul;119(1):1–4.

119. Coura CI, Schijman AG. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Rev Esp Salud Pública*. 2013. Available from: <https://redalyc.org/articulo.oa?id=79930364011>
120. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Ávila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1805–13.
121. Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch ACC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med*. 2002 Feb 18;195(4):401–13.
122. Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HMS, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* blood-stream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol*. 2007 Oct;37(12):1319–27.
123. Carranza JC, Valadares HMS, D'Ávila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvão LMC, et al. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol*. 2009 Jul 15;39(9):963–73.
124. Diosque P, Barnabé C, Padilla AM, Marco JD, Cardozo RM, Cimino RO, et al. Multi-locus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int J Parasitol*. 2003 Sep 1;33(10):997–1003.
125. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SD. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 2004;99(1):1–12.
126. Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2010 Sep 1;51(5):485–95.
127. Herrera C, Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Sosa-Estani S, Cafferata ML, et al. Phylogenetic analysis of *Trypanosoma cruzi* from pregnant women and newborns from Argentina, Honduras, and Mexico suggests an association of parasite haplotypes with

- congenital transmission of the parasite. *J Mol Diagn.* 2019 Nov 1;21(6):1095–105.
128. Ortiz S, Zulantay I, Solari A, Bisio M, Schijman A, Carlier Y, et al. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Trop.* 2012 Dec;124(3):243–6.
129. Perez-Ramirez L, Barnabé C, Sartori AMC, Ferreira MS, Tolezano JE, Nunes EV, et al. Clinical analysis and parasite genetic diversity in human immunodeficiency virus/Chagas' disease coinfections in Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61(2):198–206.
130. Murta SMF, Romanha AJ. Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1(SUPPL. 1):177–80.
131. Lewis MD, Ma J, Yeo M, Carrasco HJ, Llewellyn MS, Miles MA. Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: systematic selection of assays allowing rapid and accurate discrimination of all known lineages. *Am J Trop Med Hyg.* 2009 Dec;81(6):1041–9.
132. D'Ávila DA, Macedo AM, Valadares HMS, Gontijo ED, De Castro AM, Machado CR, et al. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol.* 2009 Jun;47(6):1718–21.
133. Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, et al. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology.* 2006;132(Pt 1):57–63.
134. Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic Chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Nov;4(11).
135. Shokralla S, Singer GAC, Hajibabaei M. Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol. *Biotechniques.* 2010 Mar;48(3):305–6.
136. García MP, Benavente MF, Melo AA, Roa EI, Roa SJ. Efecto de la fijación en la calidad del ADN: estudio controlado con cinco fijadores. *Rev Esp Patol.* 2006 Jul;39(3):175–9.
137. Muñoz-Calderón A, Silva-Gomes NL, Apodaca S, Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Souza LRQ, et al. Toward the establishment of a single standard curve for quantification of *Trypanosoma cruzi* natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence. *J Mol Diagn.* 2021 May 1;23(5):521–31.
138. Ferreira RTB, Cabral ML, Martins RS, Araujo PF, Da Silva SA, Britto C, et al. Detection and genotyping of *Trypanosoma cruzi* from açai products commercialized in Rio de Janeiro and Pará, Brazil. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):473.

139. Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods – evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 2005 Dec 7;5:31.
140. Ward AI, Lewis MD, Khan AA, McCann CJ, Francisco AF, Jayawardhana S, et al. In vivo analysis of *Trypanosoma cruzi* persistence foci at single-cell resolution. *mBio.* 2020;11(4).
141. Messenger LA, Miles MA, Bern C. Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015 Aug 1;13(8):995–1029.
142. Pinto JJ, Pinazo MJ, Saravia J, Gainsborg I, Magne HR, Cuatrecasas M, et al. Characterization of digestive disorders of patients with chronic Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Heliyon.* 2019;5(2).
143. Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezos J, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: Epidemiological and clinical profile. *Clin Microbiol Infect.* 2014 Jul 1;20(7):706–12.
144. Dutra WO, Gollob KJ. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(5):492–8.
145. Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JCO, Carneiro CM, Machado-Coelho GLL, Vitelli-Avelar DM, et al. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jun;61(6):1319–27.
146. Marcon GEB, de Albuquerque DM, Batista AM, Andrade PD, Almeida EA, Guariento ME, et al. *Trypanosoma cruzi*: parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(1):85–91.
147. Da Silveira ABM, Arantes RME, Vago AR, Lemos EM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, et al. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. *Parasitology.* 2005;131(5):547–55.
148. Vago AR, Silva DM, Adad SJ, Correa-Oliveira R, Reis D d. Á. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megaesophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2003 May;97(3):308–9.
149. Kooy RF, Ashall F, Van der Ploeg M, Prosper Overdulve J. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989 Aug;36(1):73–6.

150. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Ávila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, et al. Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* Directly from Tissues of Patients with Chronic Chagas Disease: Differential Distribution of Genetic Types into Diverse Organs. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1805. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1876933/>
151. Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H, Mclatchie AP, Miles MA, et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol.* 2014 Sep;16(9):1285–300. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24712539/>
152. Lewis MD, Fortes Francisco A, Taylor MC, Burrell-Saward H, Mclatchie AP, Miles MA, et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol.* 2014 Sep;16(9):1285–300.
153. Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasites & Vectors.* 2016 Dec 7;9(1):1–20.
154. Dumonteil E, Ramirez-Sierra MJ, Pérez-Carrillo S, Teh-Poot C, Herrera C, Gourbière S, et al. Detailed ecological associations of triatomines revealed by metabarcoding and next-generation sequencing: implications for triatomine behavior and *Trypanosoma cruzi* transmission cycles. *Sci Rep.* 2018 Dec 1;8(1):14610.
155. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Navarro M, Monge-Maillo B, Díaz-Méndez M, et al. Chagas disease in Latin American migrants: A Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect.* 2011 Jul 1;17(7):1108–13.
156. Parrado R, Carlos Ramirez J, De La Barra A, Alonso-Vega C, Juiz N, Ortiz L, et al. Usefulness of Serial Blood Sampling and PCR Replicates for Treatment Monitoring of Patients with Chronic Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019. Available from: <https://doi.org/10.1128/AAC.01102-19>
157. Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from Bolivian patients. *Acta Trop.* 2006 Dec;100(3):252–5.
158. Miles MA, Souza A, Pova M, Shaw JJ, Lainson R, Toye PJ. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature.* 1978 Apr 1;272(5656):819–21.

- 159.** 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):1–12.

VIII. ANEXOS



Molecular detection and parasite load of *Trypanosoma cruzi* in digestive tract tissue of Chagas disease patients affected by megacolon

Lilian Pinto^{a,*}, Alejandro G. Schijman^b, Julio Alonso-Padilla^{c,d}, Daniel Lozano^{a,e}, Mary Cruz Torrico^e, Pietro Gamba^f, Margarita Torrez^f, Vania Lozada^g, Karina Cartagena^g, Jareth Sanchez^h, Faustino Torrico^{a,e}, Joaquim Gascon^{c,d,**}

^a Science and Applied Development Studies in Health and the Environment (CEADES) Foundation, Cochabamba, Bolivia

^b Laboratory of Molecular Biology of Chagas Disease, Institute for Research in Genetic Engineering and Molecular Biology (INGEN-CONICET), Buenos Aires, Argentina

^c Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal), Hospital Clinic - University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain

^d CIBER de Enfermedades Infecciosas, Instituto de Salud Carlos III (CIBERINFEC, ISCIII), Spain

^e Faculty of Medicine, Universidad Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia

^f Pietro Gamba Foundation Arnaldo, Cochabamba, Bolivia

^g Institute of Gastroenterology Bolivian Japanese, Cochabamba, Bolivia

^h Hospital "Dr. Manuel Ascencio Villarreal", Punata, Cochabamba, Bolivia

ARTICLE INFO

Keywords

Chagas disease
Trypanosoma cruzi
 Megacolon
 Molecular diagnosis
 Real-time PCR

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the *Trypanosoma cruzi* parasite in the Americas affects ~ 7 million people, 30% with cardiac tissue damage and 10–15% with digestive disorders. In this study, we have developed a protocol to detect the presence of the parasite and estimate its load in resected dysfunctional tissue segments of chronically infected patients with digestive megacolon. We have included samples from 43 individuals, 38/5 with positive/negative serology for Chagas disease and digestive syndromes. Samples of 1.5 to 2.0 cm² were taken from different points of the dysfunctional digestive tract in specialized centres in Cochabamba, Bolivia. *T. cruzi* cultures were performed by inoculation with NNN-LIT culture medium, and genomic material was obtained from the samples for multiplex qPCR with TaqMan probes targeting satellite nuclear DNA. Cultures failed to isolate *T. cruzi* but qPCR reached a sensitivity of 42.1% (16/38) with all three spots and in triplicate. A new quantification methodology using synthetic satellite DNA as quantitation standard revealed parasite loads ranging from 2.2×10^2 to 1.0×10^6 satellite DNA copies/ μ l. Positive samples from the distal end showed a higher parasite load. The results of the present study strengthen and add further evidence to previous findings in an experimental mouse model of chronic *T. cruzi* infection, providing a valuable tool to improve scientific knowledge on the relevance of the digestive tract in parasite persistence, and underline the need of a better understanding of host-pathogen interaction in digestive tissues, considering pathophysiology, disease immunology and response to treatment.

1. Introduction

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is the neglected tropical disease (NTD) with the highest burden in the Western hemisphere. It is endemic in 21 countries in the Americas, where reside the majority of the ~7 million people infected (WHO, 2021). Nonetheless, the disease epidemiology changed in the last few decades due to population flows and it is now considered a global threat (Gascon et al., 2010; Requena-Méndez et al., 2015). The main routes of infection in

endemic countries are through triatomine vectors transmission and congenitally from mother to child. Other described transmission routes are the intake of parasite contaminated food or drinks, through blood transfusion or organ transplant (Marín-Neto et al., 2008; Rassi et al., 2012).

The clinical course of the disease includes an initial acute stage that is usually asymptomatic (WHO, 2021; Prata, 2010). Thus, it goes unnoticed, undiagnosed and untreated, despite the fact that the efficacy of the two available drugs (benznidazole and nifurtimox) is greater the

* Corresponding author.

** Corresponding author at: Barcelona Institute for Global Health (ISGlobal), Hospital Clinic - University of Barcelona, Barcelona 08036, Spain.
 E-mail addresses: petilian046@gmail.com (L. Pinto), quim.gascon@isglobal.org (J. Gascon).

earlier the infection is treated (WHO, 2021).

Although achieving spontaneous cure is infrequent (Francolino et al., 2003), infected subjects experience a reduction of the circulating parasite levels within four to eight weeks, entering in the so-called asymptomatic (indeterminate) chronic stage of the infection (Prata, 2010; Rassi et al., 2010).

Symptomatology is mostly observed during this chronic stage, and it can take several years until it overtly manifests, thus hindering clinical diagnosis. Cardiac tissue damage is the main clinical sign affecting around 30% of those chronically infected (Rassi et al., 2012). Disruption of digestive tract tissues is described in between 10% and 20% of the patients, and it can be observed on its own or accompanying cardiac damage (Pinto et al. 2019). Central neurological alterations have also been described to affect a lower proportion of infected individuals (Carod-Artal and Gascon, 2010).

T. cruzi infection can affect any part of the digestive tract, but the most commonly involved are the esophagus and the colon (Pinto et al., 2019; Matsuda et al., 2009). Such infection can lead to gastrointestinal complications, which can be highly morbid and seriously influence the quality of life of those suffering them. Overall, pathogenesis of *T. cruzi* infection is yet a controversial matter (Pinazo et al., 2010), but the fundamental damage that occurs and that ultimately results in megaviscerals is the destruction of the neurons of the enteric nervous system (Jantorno et al., 2007) and an important reduction in the number of interstitial cells of Cajal (Hagger et al., 2000). The histopathological changes evident in chagasic/megacolon tissue specimens appear as signs of degeneration most clearly in the dilated megacolon region and in the anal region (non-dilated) (Jabari et al., 2014).

Current knowledge points to mixed mechanisms that entail the participation of the parasite (Lages-Silva et al., 2001), autoimmune-mediated phenomena (López et al., 2006), microvascular alterations and autonomic denervation (Oliveira et al., 2009; Pinazo et al., 2010). Regarding digestive involvement, there is limited data on the parasite persistence in chronically infected intestinal tissues. Former histological studies identified parasite persistence in gastrointestinal samples in 20% to 50% of megaeosophagus cases (Cobo et al., 2012). Other authors reported the presence of *T. cruzi* kinetoplast DNA (kDNA) in 100% of the samples analyzed by conventional PCR (da Silveira et al., 2005).

On the other hand, in animal models of *T. cruzi* infection, evidence of the continuous presence of parasites in the digestive tract has been described (Lewis et al., 2014). In fact, *ex vivo* imaging of chronically infected mice showed that the digestive tract is constantly acting as a parasite reservoir, particularly the colon and the stomach, at least in that model of animal infection (Lewis et al., 2014).

However, little is known about the characteristics of the damage to the digestive tract in patients suffering from chronic Chagas disease. With the aim to aid in the analysis of digestive Chagas, we have developed and evaluated techniques for the detection and quantification of *T. cruzi* DNA in digestive samples. These were dysfunctional histological segments resected from chronically infected patients undergoing surgery due to the severity of their digestive affection.

2. Materials and methods

2.1. Ethics

All procedures complied with the statements of the Declaration of Helsinki. The study protocol and informed consent form were revised and approved by the ethical committees of Fundación CEADES (No. 0990-0279/FWA:00024189; Cochabamba, Bolivia) and that of the Hospital Clínic of Barcelona (2013/8736; Barcelona, Spain).

2.2. The study

It was designed as a transversal case control study that prospectively

included patients attending for megacolon surgical treatment requiring resection of the dysfunctional segments. Study participants were recruited in three specialized centers located in the department of Cochabamba (Bolivia): Hospital Gastroenterológico Boliviano Japonés (Cochabamba), Fundación Pietro Gamba (Anzaldo) and Hospital Manuel Asensio Villaruel (Punata). Participants were confirmed to be chronically infected with *T. cruzi* by means of two commercial conventional serological assays: Chagatest ELISA® Recombinante v3.0 (Wiener lab, Rosario, Argentina) and Chagatest ELISA based on whole parasite lysate antigens (Laboratorio Lemos, Buenos Aires, Argentina).

Sample collection took place between July 2014 and July 2016. Participation was totally voluntary and a written informed consent was obtained from all participants, compulsory for their inclusion in the study. In total, 38 chronic Chagas disease patients (positive anti-*T. cruzi* serology) with different digestive clinical signs were included. Patients suffering from other digestive syndromes distinct from Chagas disease were included as controls ($n = 5$).

Samples were collected in triplicate from three different sites within the resected dysfunctional segment: distal, central, and proximal segments; with an approximate size of 1.0 to 2.5 cm². Of each piece, half was preserved for culture in a 15 mL conical propylene tube with a solution of 0.9% sodium chloride (NaCl) and 100 µg/mL of gentamicin, and another half was preserved in a conical tube with 70% ethanol (Shokralla et al., 2010; García et al., 2006) for multiplex Real Time-PCR.

2.3. Tissue culture

Samples in NaCl and gentamicin buffer were kept at room temperature and, upon arrival to the laboratory, immediately washed three times with the same buffer under a laminar flow hood to eliminate potential contaminants. Next, four to five tissue fragments with a diameter of 3 mm were taken from different sites of the samples, crushed in a glass mortar and the solution obtained inoculated into three tubes with NNN-LIT culture medium. Tubes were incubated at 26 °C and examined microscopically 30, 60, and 90 days after inoculation. This procedure was performed in the Parasitology laboratory of the Biomedical Research Institute (IBISMED; Faculty of Medicine, University Mayor de San Simón, Cochabamba, Bolivia).

2.4. Sample processing and DNA extraction from colorectal resected tissue

Samples preserved in ethanol 70% were washed three times with abundant 70% ethanol to remove contaminants on the same day of re-collection. Each piece of tissue was placed in a 15 mL conical tube with 70% ethanol and stored at -80 °C until needed.

In stored samples, differences in size, pathological alterations and disease progression were observed in the tissue samples of included patients therefore they were subjected to fragmenting into smaller pieces with a sterile scalpel, which was sprayed with liquid nitrogen to further contribute to the fragmentation and homogenization. Approximately 40 mg of each sprayed tissue was stored in 1.5 mL Eppendorf tubes at -20 °C.

To minimize the risk of contamination between samples, all equipment used was thoroughly washed with a 10% sodium hypochlorite solution and UV irradiated. Each pulverized sample was digested overnight at 55 °C in 400 µL of a solution containing 4 M urea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA and 40 µL of proteinase K (20 mg/mL, Roche Applied Science) at pH = 7.4.

DNA extraction and purification was performed following a semi-automatic procedure based on the commercial DNA MultiSample ultra 2.0 magnetic bead kit (Applied Biosystems, Lithuania) and the King-Fisher robot (Thermo Fisher, Lithuania) following the manufacturer's instructions, with a final elution volume of 100 µL. Purified DNA was stored at -20 °C for molecular analysis.

2.5. *T. cruzi* DNA amplification

We followed the Real Time PCR protocol described by Piron et al. (2007) that amplifies a fragment of 166 bp of the satellite DNA repeats of the *T. cruzi* nuclear genome to determine ongoing parasitemia in *T. cruzi*-infected patients. Parasite specific DNA amplification was made using the following primers (5'–3'): Cruzi 1 STCGGCTGATCGTTTTCGA; Cruzi 2 AATTCTCTCCAAGCAGCGGATA; and the TaqMan probe Cruzi 3 FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB.

An endogenous internal amplification control (IAC) targeting the human RNase P gene (Applied Biosystems) was included to monitor the process (Piron et al., 2007). Controls of positive amplification of 10 fg/μl and 1 fg/μl purified parasite DNA from *T. cruzi* strain CL-Brener (discrete typing unit VI) were included in all experiments, and as a control, a tissue sample taken from a patient with negative serology. Real-time PCR was performed in a thermocycler CFX-96 (BioRad, Hercules, USA) according to the following incubation steps: 2 min at 50 °C; 1 min at 95 °C; 40 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 58 °C.

2.6. Estimation of parasitic loads in qPCR positive samples

We used a standard curve made of serial dilutions of a synthetic satDNA oligonucleotide repeat to estimate the parasite load in Real Time-PCR positive tissue samples, regardless of the parasite strain or discrete typing unit, allowing the direct comparison of loads between samples (Muñoz-Calderín et al., 2021). To build this standard curve, total DNA obtained from a pool of digestive tissues from seronegative individuals, as a matrix equivalent to the clinical specimens, was mixed with synthetic *T. cruzi* satDNA oligonucleotide and serial 1/10 dilutions were made for the points of the standard curve.

2.7. Statistical analysis

The analysis of results was performed in Microsoft Office Excel (version 2010) where frequencies and/or percentages of events were calculated. Generally, values are shown as mean with standard deviation (SD). Due to the potential presence of Real-Time PCR inhibitors or poor DNA extraction yield, we applied Tukey criteria to detect those samples with atypical outlier values (Vago et al., 2003).

3. Results

Mean age of participants was 61 years old (range 40–80 years), 42% of them were women ($n = 18$) and 58% ($n = 25$) were men. According to the clinical classification, the predominant sign observed within the group of patients with Chagas disease was dolichomegacolon (26/38; 68.4%), which is characterized by colonic dilatation. On the other hand, 6/38 (15.7%) were clinically diagnosed with megasigmoid or sigmoid colon; 4/38 (10.5%) were diagnosed with volvulus and could reestablish their intestinal transit by endoscopic decompression. Only 5.3% (2/38) presented mixed cardiac and digestive symptoms. In the control group, two people managed to reestablish their intestinal transit through laparoscopic Hartmann, while three presented dolichomegacolon (Table 1).

Despite culturing efforts, no parasites could be isolated, likely due to the intestinal nature of the samples. A heavy contamination with

bacteria was usually observed, and it was not possible to grow parasites in any of the three samples from each of the three distinct sites of the resected segments subjected to culture.

Tissue samples preserved in 70% ethanol at -80 °C were used to extract DNA for subsequent multiplex real-time PCR evaluation. Overall, the isolation of DNA from the samples with the semi-automated magnetic bead-based system performed well, the A260/A280 ratio between 1.8 and 2.0 corresponds to a highly pure DNA (90–100%); the mean obtained with the samples was 1.95 ± 0.06 , the amount in ng/μl with a mean of 399.48 ± 374.93 , a variability attributable to the diversity of tissue samples from included patients.

Furthermore, the extracted DNA showed no signs of degradation according to the average amplification cycle threshold (Cq) readings of the endogenous human RNase P gene (Table 2). This would support the viability of parasite DNA amplification when processed and stored in 70% ethanol. Notably, most samples were stored for more than two years and parasite DNA amplification from them was still possible (Table 2).

All samples from seronegative patients were negative by qPCR. In comparison, it was possible to amplify the parasite satDNA in 16 out of 38 cases of digestive Chagas disease (Table 2). Remarkably, such rate of genetic detection was feasible due to the performance of one DNA extraction per tissue region followed by qPCR in triplicate of each DNA sample from the three different regions of the resected tissue. In fact, the sensitivity of the qPCR, i.e., the number of positive *T. cruzi* DNA detections among the total number of serologically positive cases, was influenced by the number of technical replicates.

Regardless of whether the tissue sample was proximal, central or distal, qPCR performed in triplicate (three replicates per DNA sample), resulted in an average of RNaseP-DNA Cq value of $17.86 (\pm 1.40)$ for the proximal end samples, $18.33 (\pm 1.58)$ for the central end, and $17.45 (\pm 1.54)$ for the distal end; altogether giving a mean value of $17.86 (\pm 0.29)$. Fig. 1 shows that the differences obtained at the three collection points were not significant (Fig. 1).

The qPCR sensitivity for *T. cruzi* DNA obtained from all three sampling points was 42.1% (16/38), in comparison, when a single replicate was performed, the sensitivity lowered to $\leq 25\%$ (Fig. 2).

Statistical significance around the value of the proportions is shown by drawing CI95% upper and lower limits.

The sensitivity of the qPCR for the detection of *T. cruzi* increased with the number of tissue samples tested at all three sites. The difference in overall sensitivity versus the estimated sensitivity per sampling point, with a 95% CI around the proportions, was not statistically significant within the study population (Fig. 2).

If the qPCR results are compared to the clinical status of each study case, then the samples that showed a higher rate of positivity were those from megasigmoid (5/6) and intestinal transit restitution by volvulus (3/4). In contrast, the most numerous clinical group (dolichomegacolon) registered seven positive detections of parasite DNA out of 26 cases.

The ratio between clinical diagnosis and mean parasite load, expressed as satellite DNA copies/μl, ranged from 2.2×10^2 at the central transverse end to 1.0×10^5 at the distal descending end. In addition, quantification of parasite load in tissue samples showed high heterogeneity of *T. cruzi* DNA burden, with higher values in the distal regions in all clinical scenarios (Table 3, Fig. 3).

Parasitic Load values in y-axis are expressed as copies of satDNA/μl.

Table 1
Classification of the study cohort in terms of clinical and serological readouts.

	Dolichomegacolon		Megasigmoid		Volvulus		Megacolon/ cardiomegaly		Total		
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
Sex/Chagas serology											
Positive	15	11	4	2	1	3	1	1	1	38	
Negative	3	0	0	0	0	2	0	0	0	5	
Total	18	11	4	2	1	5	1	1	1	43	

M, male, F, female.

Table 2
Multiplex real-time PCR results obtained with samples from all *T. cruzi*-infected participants.

Study No.	Chagas serology	Proximal end ascending colon			Central end transverse colon			Descending end distal colon			Result
		Mean Cq <i>T. cruzi</i> (SD)	Mean copies/ μ L	Mean Cq RNAseP	Mean Cq <i>T. cruzi</i> (SD)	Mean copies/ μ L	Mean Cq RNAseP	Mean Cq <i>T. cruzi</i> (SD)	Mean copies/ μ L	Mean Cq RNAseP	
01	+	ND	ND	18.47	ND	ND	17.16	34.25 (0.88)	440.83	20.53	+
02	-	ND	ND	19.23	ND	ND	18.2	ND	ND	16.2	-
03	+	31.14 (0.10)	3.8×10^7	17.85	ND	ND	18.2	ND	ND	18.24	+
04	+	ND	ND	16.34	ND	ND	18.34	ND	ND	19.09	-
05	-	ND	ND	20.0	ND	ND	18.32	ND	ND	20.54	-
06	+	ND	ND	18.39	36.69 (0.51)	63.0	16.24	ND	ND	20.2	+
07	+	ND	ND	17.81	ND	ND	19.8	ND	ND	16.17	-
08	+	37.78 (0.00)	27.0	17.32	ND	ND	17.72	21.70 (0.14)	4.6×10^8	16.15	+
09	+	ND	ND	19.45	35.99 (0.91)	110.0	16.28	23.28 (0.89)	1.4×10^8	16.1	+
10	+	31.01 (0.11)	4.3×10^7	17.14	23.20 (0.10)	1.4×10^8	15.99	36.33 (1.34)	80.0	16.71	+
11	+	28.85 (0.52)	2.2×10^8	16.29	38.64 (1.79)	21.0	16.23	ND	ND	16.02	+
12	+	ND	ND	18.65	ND	ND	18.84	ND	ND	17.4	-
13	+	38.20 (1.69)	28.0	17.22	ND	ND	18.21	35.87 (2.02)	670.0	16.56	+
14	+	35.86 (0.67)	124.0	19.32	ND	ND	18.02	25.10 (0.04)	4.4×10^3	17.59	+
15	+	ND	ND	18.3	ND	ND	18.24	ND	ND	19.14	-
16	+	ND	ND	21.05	ND	ND	17.16	ND	ND	17.8	-
17	+	ND	ND	20.75	ND	ND	17.84	ND	ND	19.77	-
18	+	ND	ND	17.67	31.98 (2.22)	3.7×10^2	16.79	ND	ND	17.29	+
19	+	ND	ND	16.08	ND	ND	20.03	ND	ND	19.65	-
20	-	ND	ND	17.58	ND	ND	21.45	ND	ND	16.62	-
21	+	ND	ND	16.39	ND	ND	21.09	ND	ND	16.57	-
22	+	ND	ND	19.2	ND	ND	21.12	ND	ND	14.5	-
23	+	ND	ND	18.71	ND	ND	17.99	ND	ND	16	-
24	+	ND	ND	18.8	ND	ND	17.53	ND	ND	15.49	-
25	+	ND	ND	19.77	ND	ND	17.66	ND	ND	18.3	-
26	+	ND	ND	20.03	36.24 (3.10)	340.0	17.22	ND	ND	15.55	+
27	+	ND	ND	15.34	ND	ND	16.78	ND	ND	17.17	-
28	+	ND	ND	17.29	ND	ND	17.88	ND	ND	19.05	-
29	+	ND	ND	16.33	ND	ND	19.25	ND	ND	18.47	-
30	+	ND	ND	14.94	ND	ND	18.19	ND	ND	17.32	-
31	+	ND	ND	18.31	ND	ND	20.61	ND	ND	16.38	-
32	-	ND	ND	16.91	ND	ND	22.66	ND	ND	15.26	-
33	+	ND	ND	18.01	ND	ND	21.6	ND	ND	16.56	-
34	+	31.98 (2.06)	4.6×10^7	16.64	ND	ND	17.86	ND	ND	17.71	+
35	+	33.51 (2.22)	1.1×10^7	18.25	ND	ND	17.99	ND	ND	18.29	+
36	-	ND	ND	16.7	ND	ND	18.48	ND	ND	15.83	-
37	+	ND	ND	17.34	ND	ND	18.87	ND	ND	16.9	-
38	+	ND	ND	17.51	ND	ND	18.67	ND	ND	17.95	-
39	+	ND	ND	16.19	ND	ND	19.38	ND	ND	18.68	-
40	+	ND	ND	18.59	ND	ND	18.16	29.06 (0.71)	2.0×10^4	17.39	+
41	+	ND	ND	16.68	35.10 (0.49)	210.0	16.26	ND	ND	18.36	+
42	+	38.36 (5.02)	24.66	16.86	ND	ND	18	ND	ND	18.63	+
43	+	ND	ND	18.17	ND	ND	17.22	ND	ND	17.37	-

ND, not determined; +, positive; -, negative; SD, standard deviation; Cq, average amplification threshold cycle.

Table 3
T. cruzi parasitic loads at tissue collection sites in different clinical forms of digestive Chagas disease.

Clinical diagnosis	Colon tissue segment (mean Cq values and parasitic loads)								
	Ascending proximal end Men (\pm SD)			Transverse central end Men (\pm SD)			Descending distal end Men (\pm SD)		
	Cq <i>T. cruzi</i>	Copies satDNA/ μ L	Cq RNAseP	Cq <i>T. cruzi</i>	Copies satDNA/ μ L	Cq RNAseP	Cq <i>T. cruzi</i>	Copies satDNA/ μ L	Cq RNAseP
Vulvulus	33.51 (9.85)	$1.1E+04$ (24.00)	17.54 (1.40)	33.54 (12.37)	$9.0E+02$ (85.23)	18.61 (1.53)	ND	0	17.35 (1.37)
Dolicomegacolon	36.58 (14.77)	$1.1E+04$ (21.04)	17.83 (1.41)	36.11 (13.51)	$2.2E+02$ (66.09)	18.17 (1.41)	28.77 (11.80)	$1.0E+06$ (128.64)	17.58 (1.43)
Megasigmoid	30.33 (14.52)	$1.0E+04$ (21.98)	17.86 (1.46)	32.84 (13.26)	$4.9E+04$ (61.23)	18.28 (1.42)	32.69 (11.32)	$1.0E+04$ (115.31)	17.44 (1.39)
Megacolon/ cardiomegaly	35.86 (0.67)	$1.2E+03$ (65.22)	19.32 (0.43)	ND	0	0	25.1 (0.043)	$4.4E+05$ (11,762.33)	17.70 (0.12)

*ND, not determined.

of tissue-extracted DNA.

4. Discussion

Between 10 and 20% of subjects chronically infected with *T. cruzi* in

Cochabamba, Bolivia, is affected by digestive symptoms (Pinto et al., 2019). However, the available data on the presence of parasites in the intestines is very limited, as the demonstration of the presence of *T. cruzi* in the gastrointestinal tract is difficult due to the lack of robust methodologies to detect the rare presence of parasites (Prata, 2010).

Several authors agree on the fact that the distinct clinical outcomes observed in Chagas disease, including the differential involvement of target organs, is influenced by host and pathogen factors, such as their genetic backgrounds (Dutra and Gollob, 2008; Martins et al., 2008).

In a recent series of studies in an innovative experimental model of acute and chronic *T. cruzi* infections in mice, it has been determined that the persistence of the parasite was prominently observed in digestive tissues (Lewis et al., 2014). If such observation is extrapolated to humans, the phenomenon could play a role in the development of Chagas disease digestive forms. Nonetheless, to be able to better understand the host-pathogen interactions and the clinical outcome of digestive Chagas disease, it is very important to count with established methodologies for the collection, storage and molecular analysis of the parasite presence in biological samples.

In this regard, in the present study we adapted the recommendations by Shokralla et al. (2010), taking into consideration the environment and work routines of the collaborating centers involved. Such procedures helped to optimally collect the tissues and preserve their cellular integrity towards DNA extraction despite of their highly contaminated nature. It was due to this contamination that no parasites could be isolated from any of the samples set to grow in NNN LIT media. Thus, we were unable to observe their growth at 30, 60 and 90 days with the methodology followed.

A first and fundamental step towards the molecular and genomic identification of samples is the extraction and purification of DNA from them (Eguarte et al., 2007; Dittrich-Schroder et al., 2012). In this study, tissue samples rich in mucosal content were subjected to a pulverizing pre-treatment with liquid N₂ before digestion with proteinase K.

Such pulverization pre-treatment step was very relevant, especially taking into account the origin of the samples, that favored their solubility and homogenization of the mucus layers they carried within, to take 40 mg and easily extract the DNA from the tissues. A semi-automated DNA extraction procedure based on the use of magnetic beads contributed to reduce the time of the procedure and led to clean and reproducible extractions (Milligan et al., 1998; Chen et al., 2010). The obtained DNA was shown to be very suitable for qPCR amplification, with the ratio of A260/A280 showing a mean value of 1.95 ± 0.06 , indicator of a good yield.

There is only a limited amount of data on the detection of *T. cruzi* presence in the intestinal tissue of humans. Virreira et al. (2006) typed the *T. cruzi* discrete typing units (DTUs) in megacolon samples from 18 Bolivian patients using kDNA probes specific for TcI, TcII, TcV and TcVI. Most samples (16/18) were classified as DTU TcV.

The work carried out by Marcon et al. (2011) aimed at detecting and quantifying *T. cruzi* in paraffin-embedded cardiac and gastrointestinal tissue samples from chronic patients using Nested-PCR and Sybr Green-qPCR methods, demonstrated that the presence of the parasite in the tissues is essential for the pathogenesis of Chagas disease.

In another study, esophagus tissue samples were obtained from six chagasic patients with megaesophagus, eight chagasic patients without megaesophagus and six control individuals submitted to necropsy or surgery procedures. *T. cruzi* presence was detected in 100% of the Chagas disease cases with megaesophagus and in 60% of patients without megaesophagus, which tissue samples were analyzed following a qPCR targeted to kDNA (da Silveira et al., 2005).

Also relying on a kDNA targeted PCR, Vago and collaborators detected *T. cruzi* DNA in tissue samples from 55% (5/9) of the patients affected by megaesophagous (Vago et al., 2003). Nevertheless, previous standardization studies carried out in human blood specimens, showed that kDNA may lead to a higher proportion of false positive findings with respect to satellite DNA (Schijman et al., 2011).

Accordingly, for the present work, we relied on a satDNA based real-time PCR in a duplex format that included an endogenous internal RNase P gene sequence from humans as control of integrity of the obtained DNA (Piron et al., 2007; Duffy et al., 2009). Following that protocol, maximum sensitivity was achieved from *T. cruzi* satDNA

amplification in triplicate, in DNA samples extracted from three different points from each tissue sample obtained (42.1%; 16/38).

Testing of a single sample from these tissues decreased the possibility of diagnosing *T. cruzi* in an infected patient. Accordingly, testing of samples collected from different tissue sites is recommended to improve sensitivity and generate more accurate data on the presence of *T. cruzi* in tissues of patients with digestive disease.

To the best of our knowledge, this is the first time that the parasitic burden in digestive tissues has been addressed by qPCR, employing a standard curve made of a satDNA synthetic molecule embedded in total DNA from non-infected digestive tissues as a matrix.

Positive tissue DNA samples for *T. cruzi* showed parasite loads that were highly variable between samples, ranging from 2.2×10^2 to 1.0×10^6 satDNA copies/ μ L, between the three sampling points. Differences in variability could be attributable to the diversity of the tissue samples by degree of digestive involvement, peculiar to each of the patients included, as the extracted DNA showed no signs of degradation as evidenced by the similar Cq readings of the human RNaseP gene at the three points, illustrated in Fig. 1 (statistically non-significant at all three collection points) (Fig. 2).

The use of a highly conserved satDNA synthetic sequence as a standard for quantification allows more accurate quantification of parasites belonging to any discrete typing unit (Muñoz-Calderón et al., 2021), which would allow a direct comparison of qPCR loads in samples infected with different DTUs. Therefore, if the DTU of a clinical sample could be identified, an equivalence between the dose in copy numbers of satDNA repeats and parasite genome equivalents per unit volume of the sample could be estimated if the dose of satDNA copies per parasite cell for the DTU under study is known (Vargas et al., 2004).

In Cochabamba, a high prevalence of TcV genotype has been described (Parrado et al., 2019). In this regard, assuming most samples would be infected with Tc V strains, one parasite equivalent would harbor between 49,000 and 87,000 satDNA copies, on the basis of a relative estimation of satDNA content reported by Vargas et al. (2004).

In contrast to the studies cited above, we analyzed a larger study cohort of chronic Chagas disease patients with digestive mega-syndrome manifestations, managing to detect and quantify the parasite load in 16 of 38 patients in different portions of the digestive tract and providing an advance in scientific knowledge and a valuable tool.

The present study using qPCR results supports those previously obtained by others, and provide further evidence for the relevance of the digestive tract in parasite persistence, and strongly suggests the relevance of focusing on a better understanding of host-pathogen interaction in digestive tissues, considering the role of the parasite in pathophysiology, disease immunology and response to treatment.

Our results strengthen the findings of Lewis et al. (2014) on a mouse experimental model of chronic *T. cruzi* infection that pointed at the digestive tract as a permissive niche of continuous parasite presence.

In that model, depending on the parasite strains (belonging to distinct genotypes) used to infect the animals, variable tissue tropism, type and extent of clinical manifestations were observed. Then, our next step will be to attempt genotyping the *T. cruzi* positive samples in order to better understand the role the different parasite genotypes have in the development of one clinical outcome or another (Macedo et al., 2004).

CC-BY authorship contribution statement

Lilian Pinto: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. Alejandro G. Schijman: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Resources, Writing – review & editing. Julio Alonso-Padilla: Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. Daniel Lozano: Conceptualization, Resources, Validation, Writing – review & editing. Mary Cruz Torrico: Investigation, Methodology, Validation, Visualization, Writing – review &

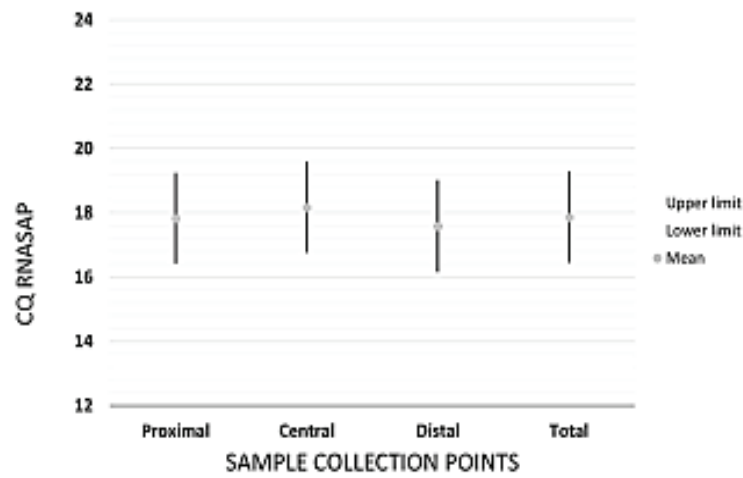


Fig. 1. Endogenous control analysis of qPCR tissue samples by point of collection. CI95% statistical significance upper and lower limits are shown for each mean Cq RNAsAP value.

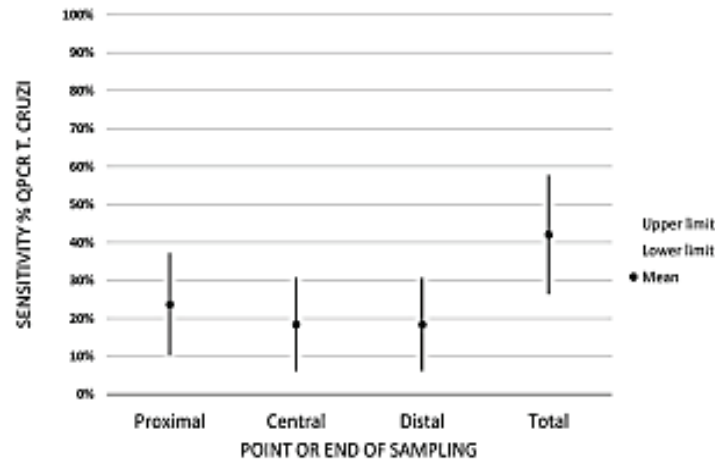


Fig. 2. Sensitivity of the qPCR in relation to tissue sampling point.

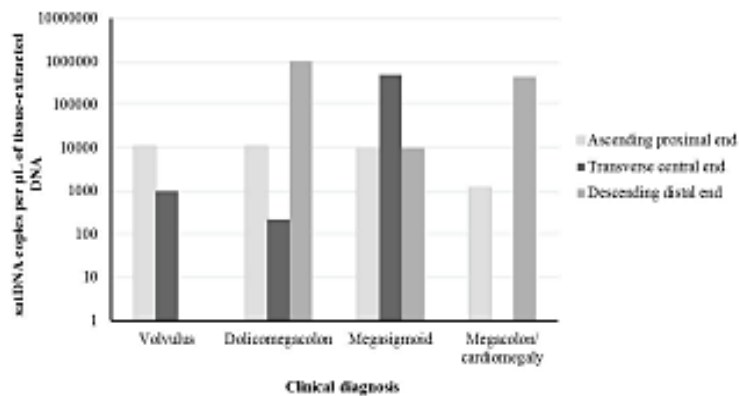


Fig. 3. Clinical diagnosis and parasite loads by region of tissue analyzed.

editing. **Pietro Gamba:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Margarita Torrez:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Vania Lozada:** Investigation, Methodology, Writing –

review & editing. **Karina Cartagena:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Jareth Sanchez:** Investigation, Methodology, Writing – review & editing. **Faustino Torrico:** Conceptualization,

Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Resources, Writing – review & editing. Joaquim Gascon: Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Validation, Visualization, Resources, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

No data was used for the research described in the article.

Acknowledgment

We would like to thank all the patients for their collaboration and all the medical, nursing and laboratory staff of the collaborating centers in Cochabamba (Bolivia) in the realization of this study.

References

- Carod-Artal, F.J., Gascon, J., 2010. Chagas disease and stroke. *Lancet Neurol* 9 (5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70042-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70042-9).
- Chen, S., Yao, H., Han, J., Liu, C., Song, J., Shi, L., et al., 2010. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS One* 5 (1), e8613. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.008613>.
- Cóbo, E.C., Silveira, T.P., Mícheletti, A.M., Crema, E., Adad, S.J., 2012. Research on *Trypanosoma cruzi* and analysis of inflammatory infiltrate in esophagus and colon from chronic chagasic patients with and without mega. *J Trop Med* 2012, 232646. <https://doi.org/10.1155/2012/232646>.
- da Silveira, A.B.M., Assencio, R.M.E., Vago, A.R., Lemos, E.M., Adad, S.J., Correa-Oliveira, R., et al., 2005. Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* tDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megasophagus. *Parasitology* 131 (Pt 5), 627–634. <https://doi.org/10.1017/S0031820505008061>.
- Dättrich-Schröder, G., Wingfield, M.J., Klöing, H., Slippers, B., 2012. DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Mol Ecol Resour* 12 (1), 109–115. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.03074.x>.
- Duffy, T., Bisio, M., Altrich, J., Burgos, J.M., Díez, M., Levin, M.J., et al., 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (4), e419. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.000419>.
- Dutra, W.O., Gollob, K.J., 2008. Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 21 (3), 287–292. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e3282f88880>.
- Ecología molecular, 2007. In: Eguarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. (Eds.), Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México.
- Francelino, S.S., Fernández Antunes, A., Talice, R., Rosa, R., Selimkio, J., De Rezende, J. M., et al., 2003. New evidence of spontaneous cure in human Chagas' Disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 36 (1), 103–107.
- García, M.P., Benavente, M.F., Melo, A.A., Rua, E.I., Rua, J.C., 2006. Effect of fixation on DNA quality: controlled study with five fixatives. *Rev Esp Patol* 39 (3), 175–179 [Article in Spanish]. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-patologia-297-articulo-efecto-fijacion-calidad-del-ada-S1699885506700344>.
- Gascon, J., Bern, C., Pinazo, M.J., 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115 (1–2), 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>.
- Hagger, R., Finlayson, C., Kahn, F., de Oliveira, R., Chimelli, L., Kumar, D., 2000. A deficiency of interstitial cells of Cajal in Chagasic megacolon. *J Auton Nerv Syst* 80 (1–2), 108–111. [https://doi.org/10.1016/S0165-1838\(00\)00076-X](https://doi.org/10.1016/S0165-1838(00)00076-X).
- Iantorno, G., Bossotti, G., Kogan, Z., Lami, C.M., Cabonne, A.M., Fisogni, S., et al., 2007. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. *Am J Surg Pathol* 31 (3), 460–468. <https://doi.org/10.1097/01.PAS.0000213371.79300.A8>.
- Jahari, S., de Oliveira, E.C., Brähler, A., da Silveira, A.B.M., 2014. Chagasic megacolon: enteric neurons and related structures. *Histochem Cell Biol* 142 (3), 235–244. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1250-X>.
- Leges-Silva, E., Crema, E., Ramirez, L.E., Macedo, A.M., Pena, S.D., Chieri, E., 2001. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megasophagus: blood and tissue parasitism. *Am J Trop Med Hyg* 65 (5), 435–441. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2001.65.435>.
- Lewis, M.D., Farias-Francisco, A., Taylor, M.C., Burrell-Seward, H., McLatchie, A.P., Miles, M., et al., 2014. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and host disease in the absence of locally persistent infection. *Cell Microbiol* 16 (9), 1285–1300. <https://doi.org/10.1111/cmi.12297>.
- López, L., Araújo, K., Giménez, E., Jiménez, M., Porcuzo, C., Rodríguez-Bonfante, C., et al., 2006. C-reactive protein and interleukin-6 serum levels increase as Chagas disease progresses towards cardiac failure. *Rev Esp Cardiol* 59 (1), 50–56. [https://doi.org/10.1016/S1885-5857\(06\)60048-0](https://doi.org/10.1016/S1885-5857(06)60048-0) [Article in Spanish].
- Macedo, A.M., Machado, C.R., Oliveira, R.P., Pena, S.D., 2004. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (1), 1–12.
- Morcon, G.E.B., de Albuquerque, D.M., Batista, A.M., Andrade, P.D., Almeida, E.A., Guariento, M.E., et al., 2011. *Trypanosoma cruzi* parasite persistence in tissues in chronic chagasic Brazilian patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106 (1), 85–91. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000100014>.
- Morin-Neto, J.A., Rassi, A., Morillo, C.A., Avezum, A., Connolly, S.J., Sosa-Estani, S., et al., 2008. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENZimidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 156 (1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2008.04.001>.
- Martins, H.R., Figueiredo, L.M., Valeniel-Silva, J.C.O., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L.L., Vitelli-Avelar, D.M., et al., 2008. Persistence of PCR-positive tissue in benzimidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. *J Antimicrob Chemother* 61 (6), 1319–1327. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn092>.
- Matuda, N.M., Miller, S.M., Evers, P.R.B., 2009. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. *Clinics* 64 (12), 1219–1224. <https://doi.org/10.1590/S1807-59322009001200013>.
- Miligan, S.B., Bodjou, J., Yaghoobi, J., Kalushian, I., Zobel, P., Williamson, V.M., 1998. The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10 (8), 1307–1319. <https://doi.org/10.1105/TPC.10.8.1307>.
- Munoz-Calderón, A., Silva-Gomes, N.L., Apolaca, S., Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Souza, L.R.Q., et al., 2021. Toward the establishment of a single standard curve for quantification of *Trypanosoma cruzi* natural populations using a synthetic satellite unit DNA sequence. *J Mol Diagn* 23 (5), 521–531. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldi.2021.01.007>.
- Oliveira, E.C., Fujisawa, M.M., Hallal Longo, D.E.M., Farias, A.S., Moraes, J.C., Guariento, M.E., et al., 2009. Neuropathy of gastrointestinal Chagas' disease: immune response to myelin antigens. *Neuroimmunomodulation* 16 (1), 54–62. <https://doi.org/10.1159/000179667>.
- Parrado, R., Ramirez, J.C., de La Barra, A., Alonso-Vega, C., Juiz, N., Ortiz, L., et al., 2019. Usefulness of serial blood sampling and PCR replicates for treatment monitoring of patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 63 (2), e001191–e001218. <https://doi.org/10.1128/AAC.0001191-19>.
- Pinazo, M.J., Carias, E., Elizalde, J.I., García, M., Goseun, J., Gimeno, F., et al., 2010. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Gastroenterol Hepatol* 33 (3), 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.gastrohep.2009.07.009>.
- Pinto, J.J., Pinazo, M.J., Saravia, J., Gainsberg, I., Magne, H.R., Cuatrecasas, M., et al., 2019. Characterization of digestive disorders of patients with chronic Chagas disease in Cochabamba, Bolivia. *Heliyon* 5 (2), e01206. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01206>.
- Pires, M., Fisa, R., Casarimjans, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., et al., 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 103 (3), 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019>.
- Prata, A., 2010. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Inf Dis* 10 (2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2).
- Rassi, A., Rassi, A., Marcendes de Bezonde, J., 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 26 (2), 275–291. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- Rassi Jr, A., Rassi, A., Morin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375 (9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)6061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)6061-X).
- Requena-Méndez, A., Allassero, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D.A.J., et al., 2015. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 9 (2), e0003540. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0003540>.
- Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Saed, M., Duffy, T., Mejía Jaramilla, A.M., et al., 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 5 (1), e931. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.000931>.
- Shokrolla, S., Singer, G.A.C., Hajibabaei, M., 2010. Direct PCR amplification and sequencing of specimens' DNA from preservative ethanol. *Biotechniques* 48 (3), 233–234. <https://doi.org/10.2144/000113362>.
- Vago, A.R., Silva, D.M., Adad, S.J., Correa-Oliveira, R., Reis, D., 2003. Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in the oesophagus of patients without megasophagus. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 97 (3), 308–309. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)0155-6](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(03)0155-6).
- Vargas, N., Pedroni, A., Zingales, B., 2004. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Mol Biochem Parasitol* 138 (1), 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.08.005>.
- Vireira, M., Serrano, G., Maldonado, L., Svoloda, M., 2006. *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from Bolivian patients. *Acta Trop* 100 (3), 252–255. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2006.11.005>.
- World Health Organization. Chagas Disease (American trypanosomiasis). Accessible at: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).