



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Utilidad de diferentes técnicas serológicas y moleculares en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas y en la caracterización de *Trypanosoma cruzi*

Alba Abras Feliu

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.

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**UTILIDAD DE DIFERENTES TÉCNICAS SEROLÓGICAS
Y MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y
SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y
EN LA CARACTERIZACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Alba Abras Feliu, 2017

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAD DE FARMACIA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente

Programa de Doctorado en Investigación, Desarrollo y Control de
Medicamentos



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

**UTILIDAD DE DIFERENTES TÉCNICAS SEROLÓGICAS
Y MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO Y
SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y
EN LA CARACTERIZACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Memoria presentada por Alba Abras Feliu para optar al grado de Doctor
por la Universitat de Barcelona.

Directoras: Dras. Montserrat Gállego Culleré y Carme Muñoz Batet

Doctoranda: Alba Abras Feliu

Alba Abras Feliu, 2017

Montserrat Gállego Culleré, Doctora en Farmacia y Profesora Titular de la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Universitat de Barcelona, y Carme Muñoz Batet, Doctora en Farmacia, responsable de la Sección de Parasitología del Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau y Profesora Titular del Departamento de Genética y Microbiología de la Universitat Autònoma de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Utilidad de diferentes técnicas serológicas y moleculares en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas y en la caracterización de *Trypanosoma cruzi*”, presentado por la licenciada en Biología Alba Abras Feliu, ha sido realizado en la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Universitat de Barcelona y en el Servicio de Microbiología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral con Mención Internacional.

Barcelona, 10 de enero de 2017.

Directoras de la Tesis Doctoral:

Dra. Monserrat Gállego Culleré

Dra. Carme Muñoz Batet

Doctoranda:

Alba Abras Feliu

*A la meva família,
el més gran dels tresors.*

*A los enfermos de Chagas,
quienes dan sentido a nuestra investigación.*

“No estalla como las bombas ni suena como los tiros.

Como el hambre, mata callando.

*Como el hambre, mata a los callados: a los que viven condenados al silencio y mueren
condenados al olvido.*

Tragedia que no suena, enfermos que no pagan, enfermedad que no vende.

*El mal de Chagas no es negocio que atraiga a la industria farmacéutica, ni es tema que
interese a los políticos ni a los periodistas.*

Elige a sus víctimas en el pabrerío.

Las muerde y lentamente, poquito a poco, va acabando con ellas.

Sus víctimas no tienen derechos, ni dinero para comprar los derechos que no tienen.

Ni siquiera tienen el derecho de saber de qué mueren.”

Eduardo Galeano

Chagas, una tragedia silenciosa. Médicos sin Fronteras, 2005.

Agraïments

Aquesta tesi no s'hagués pogut realitzar sense l'ajuda de moltes persones a qui m'agradaria donar les meves més sinceres paraules d'agraïment:

En primer lloc, a les meves directores de tesi, la Dra. Montserrat Gállego, Professora Titular de la Secció de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona, i la Dra. Carme Muñoz, Cap de la Secció de Parasitologia del Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i Professora Titular del Departament de Genètica i Microbiologia de la Universitat Autònoma de Barcelona. Gràcies per la vostra confiança i paciència, per fer-me créixer tan en l'àmbit professional com en el personal, per guiar-me en el fascinant món de la recerca i per tot l'esforç que heu dedicat a que aquesta tesi fos possible.

A la Dra. Montserrat Portús, Catedràtica emèrita de la Secció de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona, i al Dr. Joaquim Gascón, Cap del Servei de Salut Internacional de l'Hospital Clínic i Director de la Iniciativa Chagas de l'Institut de Salut Global de Barcelona (ISGlobal), per l'ajut proporcionat des de la seva gran experiència i per les valuoses aportacions a les publicacions.

Al Dr. Alejandro G Schijman, Investigador Principal del CONICET y director del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh, INGEBI-CONICET) de Buenos Aires (Argentina), por cuidarme tan bien durante mi estancia en su laboratorio y por enseñarme un sin fin de cosas sobre el mundo molecular del Chagas. A todos los miembros del LaBMECh y el INGEBI por hacerme sentir como en casa cuando estaba a muchos kilómetros de ella y muy especialmente a Natalia A Juiz y Juan Carlos Ramírez, a los que admiro, aprecio y extraño. También a los Dres. Faustino Torrico, Jose Muñoz y María Flores por haber aceptado formar parte del tribunal.

A l'equip de Parasitologia de la Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació de la Universitat de Barcelona i en especial a la Dra. Cristina Ballart, la Sílvia, l'Anna i la Rita pel suport i l'ajuda que m'han donat durant aquests anys i també per tots els moments compartits.

Als Drs. Ferran Navarro i Pere Coll pels consells i per les revisions dels treballs. A la resta del personal del Servei de Microbiologia de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau i sobretot a en Pere Berenguer, la Dra. Teresa Llovet i la Mercedes Herrero per la seva incalculable ajuda amb les serologies. També a l'equip de l'Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau). A les Dres. Elisenda Miró i Paula Espinal per acollir-me durant les setmanes que vaig estar al seu laboratori. També a la Judit, en Marc, la Montse, la Laura i la Yaide per ajudar-me en tot moment.

Als companys del Laboratori d'Ictiologia Genètica (LIG) de la Universitat de Girona, i molt especialment a la Dra. Marina Roldán, per donar-me l'oportunitat de formar part del seu equip.

Al personal de la Unitat de Genòmica dels Centres Científics i Tecnològics (CCiT-UB) per l'ajuda amb les PCRs i la seqüenciació. També als companys del Comitè Ètic d'Experimentació Animal (CEEA-UB) i sobretot al Dr. Álvaro Gimeno i la Raquel Corral, amb els que he compartit dos anys molt enriquidors.

Al millor professor que he tingut mai, en Pere Amat, per ensenyar-me a estimar la Biologia i per preocupar-se per mi. Gràcies a ell vaig escollir dedicar-me a la ciència i per això li estaré eternament agraïda. Pere, sempre ocuparàs un lloc molt especial a la meva vida.

A la meva professora d'anglès, la Dolors Ferrer, per ajudar-me amb els dubtes existencials en els articles. I a en Marc Juanola, per dissenyar-me les cobertes de la tesi i per fer-ho amb un entusiasme que s'encomana. Ningú ho hagués fet millor que tu.

A les meves amigues de la carrera de Biologia a la Universitat de Girona, a les que trobo molt a faltar. També a les meves nenes, Laura, Desi, Mire, Sara i Marina, i als petits Abril, Marc, Hugo i Maria, amb els que la colla va creixent. A la Sara i l'Albert, per tot el que hem viscut i per fer-me padrina dels seus preciosos bessons, Pau i Martí, als que adoro. I a tots els meus amics que a la seva manera també m'han donat un cop de mà durant aquests anys.

A la meva família. Indiscutiblement el més gran del tresors. Al meu pare per dir-me sempre les veritats, tot i que a vegades no m'agradin, però sobretot per creure en mi. A la meva mare per ser la més fidel i incondicional de les mares, per les seves abraçades curatives i per la paciència infinita. A la meva germana per ser-hi sempre que la necessito i per aconsellar-me quan estic perduda. Al meu cunyat, en Pablo, pels bons

moments que compartim i per les seves reflexions. Als meus nebots, Pau i Valèria, per fer-me oblidar dels problemes i per convertir-me en la “Tia Alba”, el títol del que em sento més orgullosa. Al meu avi Joan, que no acaba d’entendre a què dedico tant de temps i que sempre em pregunta si estudiaré tota la vida i a les meves àvies Teresa i Rosa i al meu avi Josep, en pau descansin, perquè sé que siguin on siguin segur que es senten molt orgullosos de mi. Com diu el poema de Miquel Martí i Pol, “us visc intensament sense tenir-vos”. També als meus sogres, Josep i Teresa, i a la meva àvia política, Montserrat, per admirar la meva feina i cuidar-me. Família, mai us podré agrair prou tot el que em doneu. Em sento tant afortunada de tenir-vos!

Al meu company de viatge, en Genís, per fer-me sentir la més bonica i la millor de les persones en aquest món. Perquè sé que per tu realment és així. Gràcies per recolzar-me, per aguantar els meus desaires i per mimar-me com ningú més sap fer. Per totes aquestes coses i per moltes d’altres, t’estimo tantíssim!

Per últim i des del més profund respecte, als malalts de Chagas. Quan t’adones que darrere de la teva feina hi ha persones i que els teus esforços arriben més lluny de les quatre parets del laboratori, tot cobra sentit. Gràcies per deixar-me veure més enllà. Espero haver aportat el meu granet de sorra a millorar una mica la vida d’aquests pacients. Només per això, aquesta tesi ja haurà valgut la pena. Tampoc em vull oblidar de tots els professionals que han contribuït a la imprescindible tasca de la recollida de mostres.

Gràcies a tots, de tot cor!



L’essencial és invisible als ulls.

Antoine de Saint-Exupéry. El petit príncep, 1943.

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/SatDNA	ADN satélite/Satellite DNA
AMCHA	Iniciativa Amazónica para la enfermedad de Chagas
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
BNZ	Benznidazol
pb	Pares de bases
BrEt	Bromuro de Etidio
Bst	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CL-ELISA	chemiluminescent ELISA (ELISA Quimioluminiscente)
CMIA	Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (Inmuno-ensayo de Micropartículas Quimioluminiscentes)
CO-II	Subunidad II de la Citocromo-Oxidasa
CO-III	Subunidad III de la Citocromo-Oxidasa
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent assay (Ensayo Inmuno-enzimático)
ELISAc	ELISA con antígeno convencional
ELISAr	ELISA con antígeno recombinante
FP	Falso Positivo
GPI	Glycosylphosphatidylinositol (Glicosilfosfatidilinositol)
HAI	Hemaglutinación Indirecta
IC	Intervalo de Confianza
IFI	Inmunofluorescencia Indirecta
IgA	Inmunoglobulina A

IgM	Inmunoglobulina M
IgG	Inmunoglobulina G
INCOSUR	Iniciativa de los países del Cono Sur
IPA	Iniciativa de los Países Andinos
Kb	Kilobase
mL	Mililitros
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis (Electroforesis Enzimática Multilocus)
MLST	Multilocus Sequence Typing (Tipificación Multilocus de Secuencias)
MTq-PCR	Algoritmo de PCR Cuantitativa Multiplex con sondas TaqMan
N-PCR	Nested PCR (PCR Anidada)
LAMP	Loop-mediated isothermal Amplification (Amplificación Isotérmica de ADN Mediada por Asas)
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
LIT	Liver Infusion Tryptose (Infusión de Hígado y Triptosa)
Mucinas-tGPI	GPI-anchored mucin-like glycoproteins of the infective mammalian cell-derived trypomastigote forms
NFX	Nifurtimox
NNN	Novy-McNeal-Nicolle
NTD	Neglected Tropical Diseases (Enfermedades Tropicales Olvidadas)
OMS/WHO	Organización Mundial de la Salud/World Health Organization
ONT	Organización Nacional de Trasplantes
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
qPCR	quantitative or real-time PCR (PCR cuantitativa o a tiempo real)
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA (Amplificación al Azar de ADN Polimórfico)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)

S/CO	Sample Relative Light Units/Cutoff value (Unidades Relativas de Luz/Punto de Corte)
SAPA	Shed Acute-Phase Antigen (Antígenos Secretados en Fase Aguda)
SL-IR	Spliced-Leader Intergenic Region (Región Intergénica para Miniexón)
SNC	Sistema Nervioso Central
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TESA	Excreted-Secreted Antigens (Antígenos de Excrección-Secreción)
TESA-Blot	Western-Blot basado en TESA
TESA-ELISA	ELISA basado en TESA
TPP	Target Product Profile (Perfil del Producto Objetivo)
UDT/DTU	Unidad Discreta de Tipificación/Discrete Typing Unit
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de la Inmundeficiencia Humana
WB	Western-Blot
Z1	Zimodema 1
Z2	Zimodema 2
Z3	Zimodema 3

ÍNDICE GENERAL

<u>Índice</u>	<u>Pág.</u>
ABSTRACT	1
RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Concepto y perspectiva histórica	11
2. El agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
2.1. Morfología y formas evolutivas	12
2.2. Diversidad genética	14
2.2.1. Métodos de caracterización de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
2.3. Transmisión	20
2.3.1. Vía vectorial	20
2.3.2. Otras vías de transmisión	23
2.3.2.1. Vía transfusional	23
2.3.2.2. Transmisión por trasplante de órganos	24
2.3.2.3. Vía congénita	24
2.3.2.4. Transmisión accidental en el laboratorio	25
2.4. Ciclo biológico	26
3. La enfermedad de Chagas	27
3.1. Epidemiología	27
3.2. Patología y manifestaciones clínicas	29
3.2.1. Fase aguda	30
3.2.2. Fase crónica	31
3.2.3. Enfermedad de Chagas e inmunosupresión	32
3.3. Diagnóstico	33
3.3.1. Diagnóstico parasitológico	33
3.3.2. Diagnóstico molecular	34
3.3.3. Diagnóstico inmunológico	37
3.4. Tratamiento	42
3.4.1. Benznidazol y Nifurtimox	42

3.4.2. Perspectivas de futuro	44
3.4.3. Marcadores de eficacia terapéutica	44
3.5. Control de la enfermedad de Chagas	45
3.5.1. Control vectorial	46
3.5.2. Control transfusional	47
3.5.3. Control en el trasplante de órganos	48
3.5.4. Control de la transmisión congénita	48
3.6. Enfermedad de Chagas en España	49
II. HYPOTHESIS, OBJETIVES AND WORK PLAN	53
1. Hypothesis	55
2. Objectives	55
3. Work plan	56
III. RESULTADOS	59
Capítulo 1. “Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a Change?”	61
Capítulo 2. “Towards a new strategy for the diagnosis of congenital <i>Trypanosoma cruzi</i> infection”	73
Capítulo 3. “Identification of <i>Trypanosoma cruzi</i> Discrete Typing Units in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)”	113
IV. DISCUSIÓN	123
1. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas	126
2. Protocolos y costo-efectividad	130
3. Caracterización de <i>Trypanosoma cruzi</i> en la población inmigrante estudiada	131
V. CONCLUSIONS	135
VI. BIBLIOGRAFIA	139

ABSTRACT

ABSTRACT

Migratory flows have expanded Chagas disease to non-endemic areas. A plethora of tests for the diagnosis of the disease are available, most of them serological, but their usefulness in different population groups, infection phases and disease follow-up is still not well established. A new generation of tests has been developed but they have not been included in the current protocols, which involve the analysis of a large number of samples by several serological tests with ensuing high healthcare costs. On the other hand, serological diagnosis has the inconvenience of the high persistence of immunoglobulin G (IgG) antibodies in chronic patients and the detection of passive IgG of maternal origin in newborns of Chagas-infected women. The molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* has sought to identify associations between Discrete Typing Units (DTUs) and the clinical development of the disease. There are dozens of different molecular markers but no consensus on a protocol. Thus, the main aim of the present work was to assess the usefulness of several serological techniques used for the diagnosis and follow-up of chronic and congenital *T. cruzi* infection and to characterize *T. cruzi* genotypes in a Latin American population attending hospitals in the Barcelona area (Spain). The results show that the Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA), with 100% sensitivity in chronic patients, allowed a correct diagnosis of the majority of samples when applied as a single technique. Only gray-zone and positive serum samples with a result of ≤ 6 S/CO would need to be confirmed. In non-infected newborns, a continuous decreasing trend of passive IgG antibodies was observed but none of the serological assays seroreverted in all the infants before 12 months. Thereafter, all the serological tests achieved negative results in the totality of the samples analyzed, except CMIA. The proposed protocols would result in important savings in the cost of Chagas disease diagnosis and in the management and control of the disease. Polymerase Chain Reaction (PCR)-based flowcharts are very useful to characterize *T. cruzi* DTUs during acute infection but not sensitive enough for the analysis of patients with low parasitic loads. Satellite DNA (SatDNA) sequencing cannot discriminate between populations at the level of a single DTU but it enabled us to increase the number of characterized cases in chronic patients. The most frequently identified DTU was TcV, common in Bolivia and predominant in peripheral blood.

RESUMEN

RESUMEN

Los movimientos migratorios han permitido la expansión de la enfermedad de Chagas a zonas no endémicas. Se dispone de una gran cantidad de pruebas para el diagnóstico de la enfermedad, la mayoría de ellas serológicas, pero su utilidad en diferentes grupos de población, fases de la infección y seguimiento de la enfermedad todavía no es bien conocida. Recientemente se han desarrollado técnicas de nueva generación que no han sido tenidas en cuenta en los protocolos existentes, los que implican el análisis de un gran número de muestras por varias pruebas serológicas, con costes elevados en el presupuesto de salud. Por otro lado, el diagnóstico serológico tiene el inconveniente de la elevada persistencia de los anticuerpos tipo inmunoglobulina G (IgG) en pacientes crónicos y la detección de IgG pasivas de origen materno en recién nacidos. La caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi* en muestras de los pacientes busca identificar asociaciones entre las Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) del parásito y el desarrollo clínico de la enfermedad. Existen diferentes marcadores moleculares, pero no hay consenso sobre un protocolo. El objetivo principal del presente trabajo fue evaluar la utilidad de varias técnicas serológicas para el diagnóstico y seguimiento de la infección crónica y congénita por *T. cruzi* y para caracterizar los genotipos de *T. cruzi* en una población latinoamericana atendida en hospitales de Barcelona (España). Los resultados mostraron que el Inmuno-ensayo de Micropartículas Quimioluminiscentes (CMIA), con una sensibilidad del 100% en pacientes crónicos, permitió el diagnóstico correcto de la mayoría de las muestras cuando se aplicaba como única técnica. Sólo las muestras en zona gris y positivas con un resultado de ≤ 6 unidades relativas de luz/punto de corte (S/CO) necesitarían ser confirmadas. En los recién nacidos no infectados, se observó una tendencia decreciente continua de anticuerpos IgG pasivos pero ninguno de los tests serológicos utilizados serorevertió en todos los casos antes de los 12 meses. A partir de ese momento, todas las pruebas serológicas obtuvieron resultados negativos en todas las muestras analizadas excepto CMIA. Los protocolos propuestos permitirían importantes ahorros en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y en el manejo y el control de la enfermedad. Los diagramas de identificación basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se mostraron muy útiles para caracterizar las UDTs de *T. cruzi* durante la infección aguda pero no lo suficientemente sensibles para el análisis de pacientes con cargas parasitarias

bajas. En cambio, la secuenciación del ADN satélite (ADNsat) no permitió discriminar las poblaciones a nivel de una única UDT, pero sí aumentar el número de casos caracterizados en pacientes crónicos. La UDT más identificada fue TeV, común en Bolivia y predominante en sangre periférica.

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. CONCEPTO Y PERSPECTIVA HISTÓRICA

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una infección parasitaria, zoonótica y de transmisión vectorial causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. La enfermedad se asocia tradicionalmente con las zonas rurales de América Latina (Portús, 2010; Rassi Jr. y col., 2010) y forma parte del conjunto de 17 enfermedades tropicales olvidadas según la Organización Mundial de la Salud (OMS), comúnmente conocidas como *Neglected Tropical Diseases* (NTD) (WHO, 2010; 2013).

La primera evidencia de infección por *T. cruzi* en humanos procede de una momia Chinchorro de 9.000 años de antigüedad (Araújo y col., 2009; Aufderheide y col., 2004). Los Chinchorros fueron la primera civilización en establecerse a lo largo de la región costera sudamericana del desierto de Atacama, en el sur del Perú y el norte de Chile. A partir del siglo XVI se empezaron a describir pacientes con síntomas compatibles con la enfermedad de Chagas. También aparecieron relatos sobre el insecto vector, mucho antes de descubrir su papel en la transmisión de la enfermedad, como el del año 1835 en el diario de Charles Darwin (1809-1882) durante su viaje a bordo del Beagle (Steverding, 2014).

En 1908 el bacteriólogo e higienista brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879–1934) (Figura 1), dedicado a la lucha contra la malaria, descubrió en una de sus campañas contra el paludismo en Lassance (estado de Minas Gerais, Brasil) que los obreros que construían el ferrocarril padecían una enfermedad diferente a la malaria y fue advertido de la presencia de insectos hematófagos que picaban a los trabajadores durante la noche. Al observar preparaciones de los insectos en el microscopio descubrió la presencia de un protozoo flagelado en sus heces. Después de consultar a su maestro, el médico, bacteriólogo y epidemiólogo Oswaldo Gonçalves Cruz (1872–1917), inoculó el parásito a monos sanos consiguiendo después observar el protozoo en la sangre. También consiguió aislar al parásito de otros animales de laboratorio y lo denominó *Schizotrypanum cruzi* en honor a su mentor Oswaldo Cruz (Apt, 2009; Leone y Viotti, 2015; Steverding, 2014).

Chagas estaba convencido de que había descubierto un organismo patógeno causante de una enfermedad en el hombre pero desconocía de que patología se trataba. En 1909, extrajo sangre de numerosas personas en Lassance en busca del parásito y, finalmente, logró encontrarlo en la sangre de una niña de dos años, llamada Berenice, que presentaba edema facial y síndrome hepato-espleno-ganglionar. Chagas comunicó la enfermedad y ésta pronto fue conocida con el nombre de su descubridor, enfermedad de Chagas (Chagas, 1909). En 1912, Chagas identificó al parásito en un armadillo y de manera gradual éste fue encontrado en otros reservorios silvestres, evidenciando la naturaleza zoonótica de la enfermedad. Carlos Chagas fue nominado al premio Nobel en 1913 y 1921 pero nunca le fue otorgado debido a la dura oposición de los médicos e investigadores de la época (Apt, 2009; Steverding, 2014).



Figura 1. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879–1934), descubridor del agente causal de la enfermedad de Chagas, el protozoo flagelado *T. cruzi*. Imagen extraída de Wikimedia Commons.

2. EL AGENTE ETIOLÓGICO: *TRYPANOSOMA CRUZI*

2.1. MORFOLOGÍA Y FORMAS EVOLUTIVAS

T. cruzi es un protozoo flagelado perteneciente a la clase Kinetoplastea y a la familia Trypanosomatidae (Moreira y col., 2004; Ruggiero y col., 2015). En 2005, El-Sayed y col. publicaron la secuencia completa del genoma de *T. cruzi*. Debido a la complejidad del parásito, el gran número de secuencias repetitivas y el elevado grado de variabilidad entre los diferentes aislados, el acoplamiento del genoma aún no está del todo resuelto (Schenkman y col., 2011). El ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito está dividido en dos compartimentos bien diferenciados, el núcleo y el quinetoplasto. El

ADN nuclear (ADNn) se encuentra en el interior del núcleo celular, envuelto por una membrana nuclear con los poros típicos de los eucariotas (Teixeira y col., 2011). Entre las secuencias repetidas que se pueden encontrar en el ADNn, destaca el ADN satélite (ADNsat). Se trata de la secuencia con el mayor número de repeticiones en el genoma nuclear y representa el 10% del ADN total del parásito (Elias y col., 2003; Ienne y col., 2010; Schijman, 2015).

Los kinetoplastidos se caracterizan por la presencia de una estructura llamada quinetoplasto, cuya forma y organización estructural varía en función de la forma evolutiva (de Souza, 2008). Esta estructura contiene el ADN del quinetoplasto (ADNk) que corresponde al genoma mitocondrial del parásito y representa aproximadamente el 15-30% del ADN celular total (Araújo y col., 2009; de Souza, 1999; 2008; Teixeira y col., 2011).

El ADNk está compuesto por una red compleja de ADN formada por dos tipos de moléculas circulares: minicírculos y maxicírculos (Araújo y col., 2009; Chacín y Torres, 2010). Los minicírculos (0,5-2,5 kilobases, kb) son moléculas de ADN que codifican pequeños ácidos ribonucleicos (ARNs) encargados de modificar los transcritos de los maxicírculos en un proceso conocido como edición del ARN (de Souza, 2009). La organización de la molécula del minicírculo contiene varias zonas conservadas y variables y la cantidad y organización de estas regiones parece ser específica de cada tripanosomátido (Junqueira y col., 2005). Por otro lado, los maxicírculos son moléculas más grandes (20-40 kb), análogas al ADN mitocondrial (ADNmt) de los eucariotas superiores, que codifican los ARNs ribosomales (ARNr) y también las enzimas de los complejos respiratorios como las subunidades II y III de la Citocromo-Oxidasa (CO-II y CO-III) (Chacín y Torres, 2010; de Souza, 2009; Junqueira y col., 2005). Los minicírculos se encuentran en mayor cantidad en la célula, hasta 30.000 copias por parásito, mientras que los maxicírculos son menos frecuentes (unas docenas por célula) (Chacín y Torres, 2010; de Souza, 1999; Ferrer, 2015; Macina y col., 1986; Telleria y col., 2006).

Además del quinetoplasto, la familia Trypanosomatidae se caracteriza por la presencia de un único flagelo, que puede estar formando el borde de una membrana ondulante o ser libre en toda su longitud, y que desaparece externamente cuando viven como parásitos intracelulares (Gállego Berenguer, 2007). Una característica de *T. cruzi* es la apariencia de sus tripomastigotes hemáticos y que, a diferencia de otros tripanosomas,

su fase multiplicativa se realiza intracelularmente mediante los amastigotes (Barret y col., 2003; Gállego Berenguer, 2007; Magill y Reed, 2000; Miles, 2003).

En el hospedador vertebrado (hombre y mamíferos reservorios) el parásito se desarrolla bajo tres formas evolutivas con diferente morfología: (i) tripomastigotes (Figura 2A), hemáticos, de 16–20 μm de largo, con forma de C o S, extremo posterior afinado con un quinetoplasto voluminoso y que parece sobrepasar los bordes de este mismo extremo y con membrana ondulante con aspecto poco plegado que termina en un flagelo libre; (ii) amastigotes (Figura 2B), de 2–4 μm de largo y con capacidad multiplicativa en situación intracelular; (iii) epimastigotes (Figura 2C), intracelulares y de transición entre las dos anteriores, presentan un gran quinetoplasto en posición anterior al núcleo y una corta membrana ondulante en la región anterior (Gállego Berenguer, 2007).

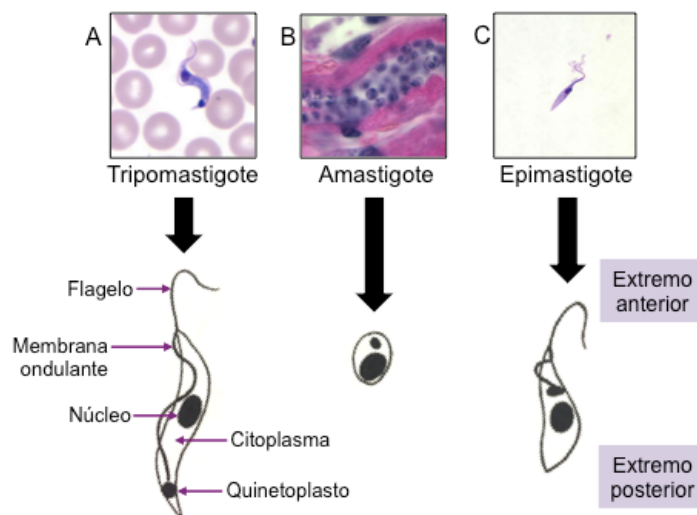


Figura 2. Tipos morfológicos de *T. cruzi* con las principales estructuras. Tripomastigote en un frotis de sangre teñido con Giemsa (A). Amastigotes en tejido cardíaco teñidos con hematoxilina y eosina (B). Epimastigote en cultivo teñido con Giemsa (C). Imágenes extraídas de CDC–DPDx y esquemas extraídos de Gállego Berenguer (2007).

Por otro lado, en el insecto vector, *T. cruzi* se desarrolla en la luz del tubo digestivo bajo las formas de epimastigote y tripomastigote. El tripomastigote es la única forma metacíclica y que puede pasar al hospedador vertebrado (Gállego Berenguer, 2007).

2.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

T. cruzi es predominantemente diploide (El-Sayed y col., 2005), se multiplica asexualmente por fisión binaria (Zingales y col., 2012) y presenta una estructura

poblacional principalmente clonal (Messenger y col., 2015b). La heterogeneidad genética del parásito se debe a la acumulación de mutaciones discretas y a procesos de recombinación puntuales (Messenger y col., 2015b; Zingales y col., 2012).

Las poblaciones de *T. cruzi* se distribuyen en las denominadas unidades discretas de tipificación (UDTs). Las UDTs se definen como “conjuntos de cepas o grupos genéticos que se encuentran genéticamente más relacionados entre ellos que con cualquier otra cepa y pueden ser identificados por marcadores moleculares o inmunológicos comunes” (Tibayrenc, 1998). Actualmente, hay descritas seis UDTs de *T. cruzi* con diferente distribución geográfica: TcI a TcVI (Zingales y col., 2009; 2012). La heterocigosis observada en las poblaciones naturales de TcV y TcVI sugieren la incorporación de procesos de intercambio genético (Messenger y Miles, 2015; Tibayrenc, 2003; Zingales y col., 2012).

Existen dos teorías para explicar las relaciones evolutivas entre las UDTs de *T. cruzi* y ambas contemplan dos procesos de hibridación (Zingales y col., 2012) (Figura 3): el modelo de las dos hibridaciones (Westenberger y col., 2005) y el modelo de los tres ancestros (de Freitas y col., 2006). El modelo de las dos hibridaciones indica un primer intercambio genético entre TcI y TcII, con pérdida de la heterocigosis entre la progenie y dando lugar a las UDTs TcIII y TcIV, seguido de una segunda hibridación más reciente entre TcII y TcIII para obtener TcV y TcVI. El modelo de los tres ancestros indica dos eventos recientes de intercambio genético entre TcII y TcIII dando lugar a las UDTs TcV y TcVI (Zingales y col., 2012). El origen de las diferentes UDTs así como sus interrelaciones siguen siendo controvertidos (Tomasini y Diosque, 2015).

Recientemente, se ha designado una nueva UDT denominada Tcbat con un patrón molecular único y que se postula como el posible ancestro de *T. cruzi* (Guhl y col., 2014; Marcili y col., 2009; Pinto y col., 2012). Este nuevo genotipo está relacionado con aislados de murciélagos en Brasil, Panamá y Colombia y también se ha detectado en humanos (Guhl y col., 2014; Lima y col., 2015; Ramírez y col., 2014).

Las cepas incluidas en una determinada UDT de *T. cruzi* no deben ser consideradas como pertenecientes a un solo clon sino a clones múltiples o a familias de clones estrechamente relacionadas ya que comparten perfiles con determinados grupos de marcadores moleculares pero pueden distinguirse, con frecuencia, con marcadores de mayor resolución (Muñoz y col., 2013; Tibayrenc y Ayala, 2015).

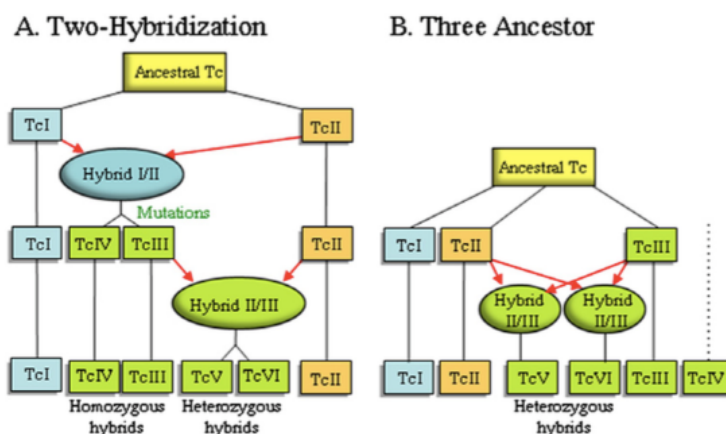


Figura 3. Comparación de los modelos de intercambio genético entre las UDTs durante la evolución clonal de *T. cruzi*: modelo de las dos hibridaciones (A) y modelo de los tres ancestros (B). Los rectángulos indican las diferentes UDTs. Los intercambios genéticos se indican con formas ovales y la contribución parental con flechas rojas. Los clados mitocondriales se muestran en diferentes colores: en azul el clado A, en verde el clado B y en naranja el clado C. El esquema ha sido extraído de Zingales y col. (2012).

La heterogeneidad del parásito se considera uno de los factores que juega un papel importante en las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas (Muñoz y col., 2013). Macedo y Pena (1998) propusieron un modelo histotrópico clonal para la enfermedad de Chagas. En este modelo se postula que los diferentes clones dentro de una cepa de *T. cruzi* podrían presentar tropismo por los diferentes tejidos del hospedador debido a su polimorfismo. La combinación de clones infectantes y su tropismo específico sería un factor clave para la determinación del curso clínico de la enfermedad. La infección humana es un evento reciente en la historia evolutiva de *T. cruzi* y, por ese motivo, es de esperar que las diferentes poblaciones del parásito tengan diversas tasas de infectividad y virulencia así como también diferente capacidad de desarrollar la enfermedad en el ser humano (Cura y Schijman, 2013). Los estudios taxonómicos actuales pretenden identificar la asociación de las UDTs con la presentación clínica de la enfermedad así como su distribución en las zonas endémicas y en los ciclos de transmisión (Duffy y col., 2013; Miles y col., 2009; Ramírez y col., 2010) aunque, de momento, se desconoce la influencia de esta diversidad genética en los diferentes escenarios clínicos en las regiones endémicas (Cura y Schijman, 2013). Además, está descrito que las infecciones mixtas son frecuentes en el caso de la enfermedad de Chagas al poder coexistir varias UDTs en un mismo vector y también en un único hospedador (Brenière y col., 2016; Pérez y col., 2014).

La UDT más extendida y abundante de *T. cruzi* en América Latina es TcI (Figura 4). Esta UDT, asociada tanto al ciclo selvático como al doméstico, se relaciona con la enfermedad de Chagas en humanos en el norte de América del Sur pero también se ha descrito de manera ocasional en el Cono Sur (Carrasco y col., 2012; Guhl y Ramírez, 2011; Llewellyn y col., 2009; Zingales y col., 2012). TcV, así como TcII y TcVI, parece estar concentrada en el centro y el sur de América del Sur y restringida a ciclos de transmisión domésticos (Carrasco y col., 2012; Diosque y col., 2014; Zingales y col., 2012). TcIII es una UDT rara en humanos y está asociada a ciclos selváticos en Brasil y en los países colindantes. TcIV es esporádica en Sudamérica a excepción de Venezuela en donde es la segunda UDT responsable de infección en humanos (Zingales y col., 2012).

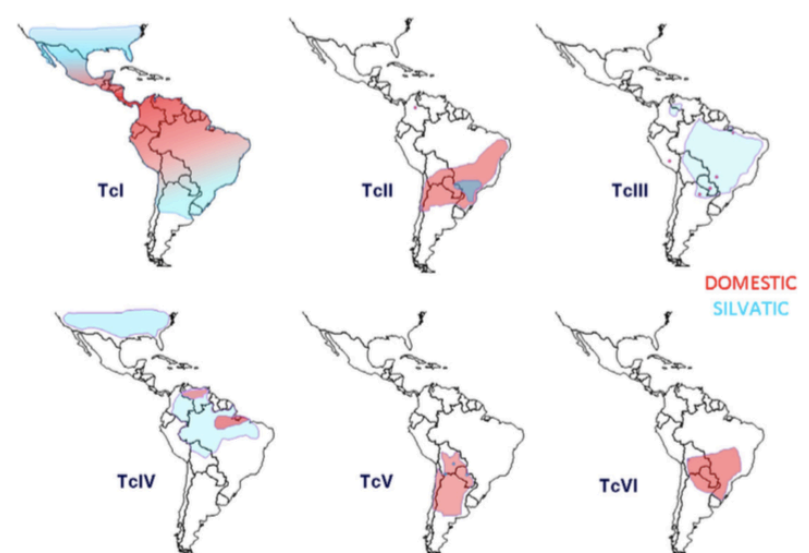


Figura 4. Distribución geográfica aproximada de las UDTs de *T. cruzi* en los ciclos de transmisión domésticos y selváticos (Zingales y col., 2012).

2.2.1. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Andrade (1974) intentó discriminar varios fenotipos de *T. cruzi* mediante estudios morfológicos y comportamentales utilizando criterios de virulencia y patogenicidad en modelos murinos. A raíz de estos estudios se definieron tres fenotipos principales (Andrade, 1974; Andrade y col, 1983), posteriormente denominados “biodemas” (Andrade y Magalhães, 1997).

El primer método experimental que demostró la gran diversidad genética de *T. cruzi* fue el análisis de variantes electroforéticas de enzimas celulares (isoenzimas), también

conocido como Electroforesis Enzimática Multilocus (MLEE) (Messenger y col., 2015a). El procedimiento se basa en la electroforesis de extractos proteicos del parásito en geles de almidón o acetato de celulosa y el revelado bioquímico con sustratos colorimétricos o fluorescentes para enzimas diferentes permitiendo diferenciar grupos isoenzimáticos llamados zimodemas (Macedo y col., 2002; Muñoz y col., 2013). En un inicio, Miles y col. (1977; 1978) determinaron la existencia de tres zimodemas diferentes y los denominaron Zimodema 1 (Z1) de origen selvático, Zimodema 2 (Z2) de origen doméstico y Zimodema 3 (Z3) con origen compartido en los dos ciclos (Guzmán-Marín y col., 1999). Tibayrenc y col. (1986) y Tibayrenc y Ayala (1988) subdividieron estos tres zimodemas en 43 y los denominaron “clonets”, es decir, “aislamientos de una especie clonal que parecen ser genéticamente idénticos entre sí sobre la base de un determinado conjunto de marcadores” (Tibayrenc y Ayala, 1991).

Morel y col. (1980) utilizaron los Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP) del minicírculo del kDNA para subdividir las poblaciones del parásito en diferentes perfiles de restricción característicos, los que denominaron “esquizodemas”. Los RFLP evidenciaron por primera vez que los clones de una misma cepa pueden presentar diversidad genética. Sturm y col. (1989) perfeccionaron la técnica mediante la amplificación por PCR del fragmento de interés (PCR-RFLP), aumentando la sensibilidad del método.

También se utilizaron otras técnicas moleculares para la caracterización de *T. cruzi* (Macedo y Pena, 1998; Murta y Romanha, 1999). Entre ellos destacan, la Amplificación al Azar de ADN Polimórfico (RAPD) y los análisis de genes y microsatélites (Oliveira y col., 1998; 1999; Souto y col., 1996; Souto y Zingales, 1993; Steindel y col., 1993; Tibayrenc y col., 1993). El resultado fue una gran variabilidad genética en los múltiples aislamientos de *T. cruzi* estudiados lo que generó una gran confusión en la denominación de los diferentes grupos propuestos (Guhl, 2013). En 1999 se llegó a un consenso para designar dos linajes de *T. cruzi*, denominados TcI y TcII (Recommendations from a satellite meeting, 1999). Más recientemente, TcII fue dividido en cinco subgrupos (TcIIa-TcIIe) (Brisse y col., 2000; 2001) los cuales fueron re-nominados en 2009 con la clasificación actual de las seis UDTs: TcI-TcVI (Zingales y col., 2009) (Tabla 1). Aunque en esta revisión de la nomenclatura no se incluyeron subdivisiones para TcI, se ha demostrado que existe una gran variabilidad genética dentro de este linaje y se ha propuesto su división en cinco subgrupos (TcIa-TcIe) (Cura

y col., 2010; Falla y col., 2009; Guhl y Ramírez, 2011; Ramírez y col., 2012). La nomenclatura actual de las UDTs de *T. cruzi* sigue generando controversia (Barnabé y col., 2016).

Tabla 1. Nomenclatura de las UDTs de *T. cruzi*.

Satellite meeting (1999)	Brisse y col. (2000; 2001)	Zingales y col. (2009)
<i>T. cruzi</i> I	TcI	TcI
<i>T. cruzi</i> II	TcIIa	TcIV
	TcIIb	TcII
	TcIIc	TcIII
	TcII d	TcV
	TcIIe	TcVI

En los últimos años, la optimización de las técnicas de biología molecular, con mayor sensibilidad, ha permitido la caracterización genética de *T. cruzi* en muestras clínicas como lesiones chagásicas y sangre periférica (Cura y Schijman, 2013). Actualmente existen diversos marcadores moleculares para determinar las UDTs de *T. cruzi* pero no existe consenso sobre cual utilizar (Brenière y col., 2016; Cura y col., 2015; Muñoz y col., 2013; Ramírez y col., 2010). Entre ellos destacan las Regiones Intergénicas para Miniexón (SL-IR), ADN ribosomal 24S α (ADNr 24S α), fragmento nuclear A10 (A10), ADNr 18S y CO-II (Brise y col., 2001; Burgos y col., 2007; 2010; Cura y col., 2013; 2015; Fernandes y col., 1999; Souto y col., 1996; Souto y Zingales, 1993). Diosque y col. (2014) propusieron recientemente un esquema de Tipificación Multilocus de Secuencias (MLST) basado en siete loci para la caracterización de las UDTs de *T. cruzi*.

Los estudios de caracterización de *T. cruzi* son limitados debido a que la mayoría se realizan en muestras de sangre periférica y son raros aquellos que utilizan tejidos lo que podría influir tanto en la carga parasitaria como en el hallazgo de determinadas UDTs por su tropismo (Burgos y col., 2010; Cámara y col., 2010; D'Ávila y col., 2009; Vago y col., 2000). Además, los estudios de genotipado también pueden quedar sesgados cuando el método implica la realización de cultivo *in vitro* o infestación experimental que conlleva una selección parasitaria (Cura y Schijman, 2013).

2.3. TRANSMISIÓN

La transmisión de *T. cruzi* en zona endémica es fundamentalmente vectorial, pero existen otras modalidades que se describen a continuación.

2.3.1. VÍA VECTORIAL

T. cruzi se trasmite a los humanos y a más de 100 de especies de animales domésticos (perros y gatos, entre ellos) y animales salvajes (carnívoros, marsupiales, roedores, primates, murciélagos, y xenartros como armadillos, perezosos y osos hormigueros) a través de insectos hematófagos pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae y subfamilia Triatominae, dando lugar a tres ciclos epidemiológicos interrelacionados: doméstico, peridoméstico y selvático (Barret y col., 2003; Gállego Berenguer, 2007; Noireau y col., 2009; Rassi Jr. y col., 2010; WHO, 2015). Una mención especial requieren las zarigüeyas (marsupiales del género *Didelphis*) ya que son capaces de mantener los amastigotes multiplicándose en los tejidos y los epimastigotes multiplicándose y diferenciándose en las glándulas olfativas (Noireau y col., 2009).

El ciclo doméstico se mantiene mediante triatominos que transmiten la infección de animales domésticos a humanos y también entre humanos. El ciclo selvático es enzoótico y se mantiene mediante triatominos y animales salvajes, mientras que el ciclo peridoméstico se origina a partir del ciclo selvático y mantiene la infección entre los animales domésticos en los alrededores de las viviendas humanas a través de los triatominos peridomésticos y, ocasionalmente, mediante intercambios con el ciclo selvático (perros y gatos que cazan animales salvajes y animales salvajes que invaden los alrededores de las viviendas humanas). Por tanto, los tres ciclos pueden interrelacionarse entre sí (Coura y Dias, 2009). El intercambio que se puede producir entre los ciclos de la enfermedad de Chagas es bidireccional o de doble sentido, con un eje central que comprende los reservorios, el parásito *T. cruzi*, los vectores y los seres humanos (Coura, 2013; Coura y Dias, 2009) (Figura 5).

Los vectores más comunes de la enfermedad de Chagas pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Barret y col., 2003; Galvão y Justi, 2015; Gorla y Noireau, 2010), entre los cuales destacan las especies *T. infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *R. prolixus* y *P. megistus* (Gourbière y col., 2012; Patterson y Guhl, 2010) (Figura 6).

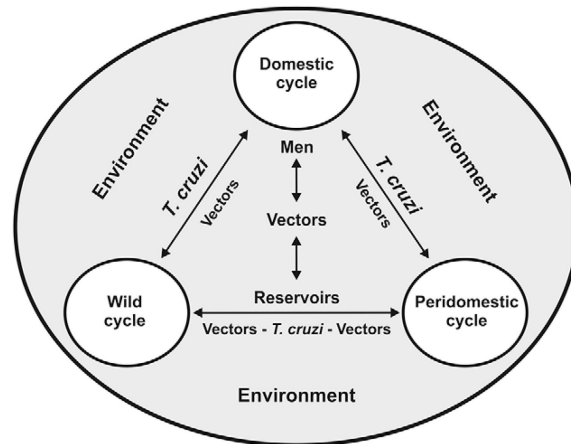


Figura 5. Intercambios entre los ciclos doméstico, peridoméstico y selvático de *T. cruzi* (Coura, 2013; Coura y Dias, 2009).

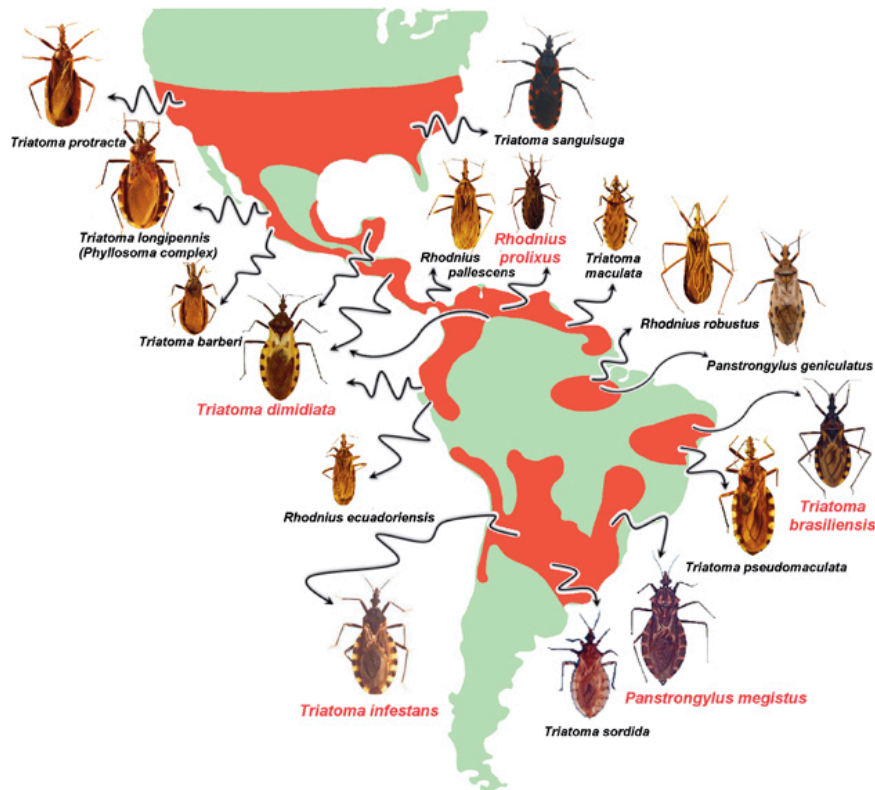


Figura 6. Distribución de las especies de triatomos de mayor relevancia epidemiológica. Las áreas rojas indican la distribución aproximada de las especies. Las especies marcadas en rojo se consideran los vectores más importantes de *T. cruzi* (Gourbière y col., 2012).

Hoy en día se consideran dos modalidades de transmisión vectorial, la cutánea y la oral (Alarcón de Noya y col., 2015b).

Los triatominos alados y de talla grande son comúnmente conocidos como chinches besuconas (Figura 7) debido a que tienen el hábito de defecar mientras se alimentan de la sangre del hospedador y al picar depositan sus excrementos sobre la piel y las mucosas labiales y de la conjuntiva palpebral (Gállego Berenguer, 2007). A esta vía de transmisión se la ha denominado como “cutánea” para diferenciarla de la oral en la que el vector también está involucrado (Alarcón de Noya y col., 2015b).



Figura 7. Triatomino, vector de la enfermedad de Chagas, defecando cerca de la herida producida después de alimentarse de sangre del hospedador vertebrado (CDC–DPDx).

Si bien la vía vectorial cutánea es el mecanismo de transmisión más frecuente en zonas endémicas (Abad-Franch y col., 2015; Prata, 2001), la vía oral parece tener también un papel importante en la transmisión de la enfermedad (Alarcón de Noya y Noya González., 2015; Coura, 2015). Éste es, probablemente, el mecanismo de transmisión más frecuente entre los animales en el ciclo selvático teniendo en cuenta que muchos de ellos se alimentan frecuentemente de insectos como los triatominos vectores de la enfermedad de Chagas (Coura, 2015).

La infección por vía oral en humanos puede ocurrir a través de la ingesta de alimentos contaminados con triatominos infectados o sus deyecciones como carne, zumo de caña de azúcar y zumos de frutas (Prata, 2001). El primer brote de la enfermedad relacionado con esta vía fue descrita en Brasil el 1967 (Nery-Guimarães y col., 1968) y a partir de ese momento el número de episodios ha aumentado con casos descritos en Brasil, Colombia, Venezuela, Guayana Francesa y Bolivia (Alarcón de Noya y col., 2015a; Noya González y col., 2015). Los focos más importantes de transmisión oral corresponden al área amazónica brasileña y están relacionados con el consumo de los frutos de la palma (Noya González y col., 2015).

2.3.2. OTRAS VÍAS DE TRANSMISIÓN

Otros mecanismos de transmisión que pueden tener lugar tanto en zonas endémicas como en zonas no endémicas son las transfusiones sanguíneas (Angheben y col., 2015), los trasplantes de órganos (Kransdorf y col., 2014), la vía congénita (Carlier y col., 2015) y los accidentes de laboratorio (Herwaldt, 2001) permitiendo así la presencia de la enfermedad en zonas urbanizadas (Pinazo y Gascón, 2015).

2.3.2.1. VÍA TRANSFUSIONAL

La transmisión por transfusión sanguínea ocurre cuando un paciente recibe sangre con tripomastigotes circulantes de *T. cruzi* de un donante infectado (Alarcón de Noya y col., 2015b). Esta vía de transmisión fue sugerida por Mazza y col. (1936) y los primeros casos de transmisión de la infección por transfusión fueron publicados por De Freitas y col. (1952). La migración de individuos asintomáticos ha conducido a la propagación de este tipo de transmisión (Angheben y col., 2015) y se han descrito casos de transmisión transfusional en países no endémicos como Estados Unidos, Canadá y España (Benjamin y col., 2012; Flores-Chávez y col., 2008b; Grant y col., 1989; Leiby y col., 1999; Nickerson y col., 1989; Pérez de Pedro y col., 2008; Villalba y col., 1992; Young y col., 2007). Recientemente también se ha publicado un caso de infección por *T. cruzi* derivado de transfusión en Suiza (Ries y col., 2016).

Se estima que la probabilidad de transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión es del 10-20% y depende, entre otros factores, de la concentración de parásitos en la sangre del donante y del componente sanguíneo transfundido (Miles, 2017; Rassi Jr. y col., 2010). La parasitemia se puede detectar en el 50% de los pacientes en la etapa crónica de la enfermedad y *T. cruzi* puede sobrevivir a las temperaturas de almacenaje más habituales (4 y 22°C) y también a los procesos de congelación-descongelación. En consecuencia, la infección puede ser transmitida por cualquier componente sanguíneo excepto los hemoderivados plasmáticos (Castro, 2009). La transfusión de concentrado plaquetas es la que tiene un mayor riesgo de transmisión de la infección por *T. cruzi* (Cancino-Faure y col., 2015; Strasen y col., 2014).

2.3.2.2. TRANSMISIÓN POR TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Los órganos trasplantados de un individuo con enfermedad de Chagas pueden contener amastigotes. Estos parásitos pueden evolucionar a tripomastigotes circulantes en los pacientes receptores inmunocomprometidos, lo que supone un riesgo sustancial de infección por *T. cruzi* derivado de trasplante (Alarcón de Noya y col., 2015b; Favalaro y col., 2015). Kransdorf y col. (2014) indican que el porcentaje de infección de los receptores de trasplante hepático o renal es del 13-22% mientras que el porcentaje de infectados por trasplante cardíaco asciende al 75-100%. En zona endémica, Chocair y col. (1981) publicaron el primer caso de transmisión de la infección por trasplante, en este caso de riñón, y se han detectado más casos (Cicora y col., 2014; Ferraz y Figueredo, 1993; Figueredo y col., 1990; Souza y col., 2008). En referencia a los países no endémicos, el primer caso documentado de transmisión derivado de trasplante fue en Estados Unidos en 2001 (CDC, 2002) y, posteriormente, han habido más casos también en Europa (CDC, 2006; Huprikar y col., 2013; Kun y col., 2009; Rodríguez-Guardado y col., 2015).

2.3.2.3. VÍA CONGÉNITA

La transmisión vertical de *T. cruzi* puede ocurrir en cualquier fase de la enfermedad (aguda, crónica indeterminada o crónica sintomática) en la que se encuentre la madre en el momento del embarazo (Torrico, 2015). Además, puede haber transmisión del parásito de la madre al feto en todos los embarazos de una mujer infectada y a través de varias generaciones (Schenone y col., 2001), lo que facilita la expansión incontrolada de la infección durante largos períodos de tiempo (Carlier y col., 2011). Todos estos elementos contribuyen a la construcción de un escenario complejo para la eliminación de esta vía de transmisión.

En los países endémicos, la prevalencia en mujeres embarazadas se encuentra entre 5 y 40% y las tasas de infección por transmisión vertical varían entre 1 y 12% en mujeres embarazadas seropositivas con gran variabilidad entre zonas (Bern y col., 2011b; Carlier y Torrico, 2003; Howard y col., 2014; Moscatelli y col., 2015; Torrico y col., 2004). En los países no endémicos, Howard y col. (2014) estiman una tasa de transmisión vertical del 2,7%. Se han detectado casos de infección congénita en Estados Unidos, Canadá, Europa y Japón (CDC, 2012; Fearon y col., 2013; Flores-Chávez y

col., 2008a; Imai y col., 2014; Jackson y col., 2009; Murillo y col., 2016; Muñoz y col., 2007; Riera y col., 2006; Voelker, 2012).

Es importante recalcar la diferencia entre dos términos que se confunden frecuentemente, mientras que la infección congénita por *T. cruzi* se refiere a casos asintomáticos y sintomáticos de la infección, la enfermedad de Chagas congénita se utiliza para describir casos sintomáticos (Carlier y col., 2015).

Los cuatro factores principales en la transmisión vertical son el parásito, la madre, la placenta y el feto (Carlier y col., 2015). De hecho, recientemente Carlier y Truyens (2015) propusieron la infección congénita por *T. cruzi* como un modelo ecológico de interacciones múltiples y complejas entre el parásito, la mujer embarazada, la placenta y el feto. Por tanto, la transmisión congénita es un evento multicausal resultado de fenómenos como la reducción de la respuesta inmunitaria específica de algunas mujeres, la edad de la madre gestante, la carga parasitaria y la invasión por *T. cruzi* de las membranas placentarias y del cordón umbilical (Torrico, 2015).

La placenta es el órgano más importante en el proceso de transmisión de los parásitos de la madre al feto (Carlier y Truyens, 2015). Juiz y col. (2016) describieron la asociación de polimorfismos humanos en los genes expresados en la placenta con la susceptibilidad a la infección congénita por *T. cruzi*. La vía transplacentaria hematogena es la vía de transmisión vertical clave (Carlier y col., 2015; Carlier y Truyens, 2015) pero también existen otras posibles vías alternativas: (i) a través de los parásitos liberados en el líquido amniótico, (ii) a través de la pared uterina (vía transuterina), (iii) la transmisión perinatal durante el parto y (iv) la transmisión postnatal mediante la leche materna (Carlier y Truyens, 2010). Aunque estas vías podrían tener lugar durante la fase aguda de la enfermedad, son muy improbables durante la fase crónica (Carlier y Truyens, 2015). En referencia a la transmisión por leche materna, aunque existen algunos estudios que informan de esta vía de transmisión, parece tener relevancia epidemiológica limitada y no se recomienda interrumpir la lactancia materna en madres con enfermedad de Chagas crónica (Norman y López-Vélez, 2013).

2.3.2.4. TRANSMISIÓN ACCIDENTAL EN EL LABORATORIO

La infección puede ser transmitida mediante la exposición a las heces de triatominos infectados y la manipulación de cultivos de *T. cruzi* y muestras biológicas de personas y

animales infectados (Herwaldt, 2001). Desde el primer caso descrito en 1938, se han observado varios casos más (Hofflin y col., 1987; Kinoshita-Yanaga y col., 2009).

2.4. CICLO BIOLÓGICO

Tal y como se ha comentado, *T. cruzi* se transmite principalmente a través de la vía vectorial en zona endémica. El ciclo biológico natural del parásito (Figura 8) es complejo con etapas de desarrollo en el insecto vector y en el hospedador mamífero (Rassi Jr. y col., 2010).

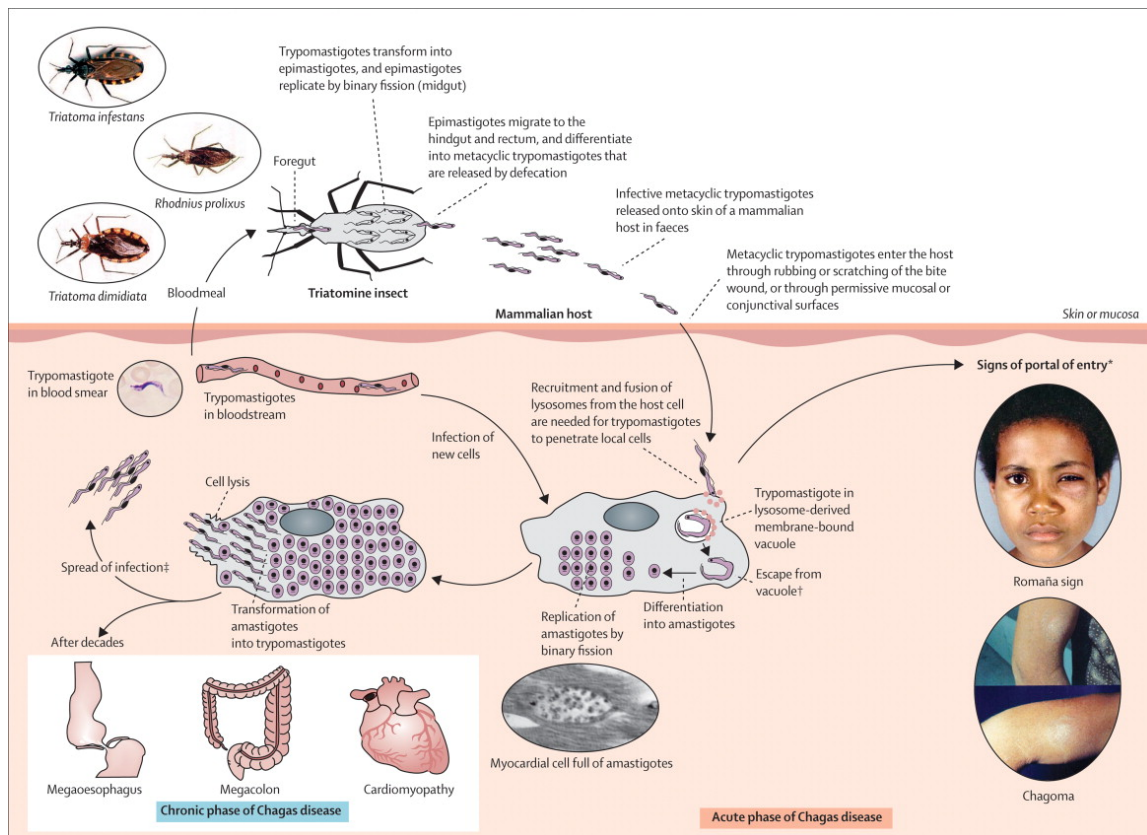


Figura 8. Ciclo biológico vectorial de *T. cruzi* (Rassi Jr. y col., 2010).

El ciclo evolutivo vectorial de *T. cruzi* se inicia cuando el triatómino hematófago, que actúa como vector, se alimenta de sangre del hospedador vertebrado y libera tripomastigotes de *T. cruzi* con las heces cerca de la herida producida por la picadura. Los tripomastigotes corresponden a la forma flagelada y metacíclica del parásito y penetran en el interior del hospedador vertebrado por la piel, a través de los microtraumatismos causados por las piezas bucales del insecto, o por las mucosas labiales y de la conjuntiva palpebral (de Souza, 2002; Gállego Berenguer, 2007).

Una vez en el interior del hospedador vertebrado, los tripomastigotes, que no tienen capacidad multiplicativa, acceden a los capilares sanguíneos de la dermis e invaden las células próximas al lugar de la inoculación (de Souza, 2002; Gállego Berenguer, 2007). Cualquier célula nucleada es diana del parásito pero sobre todo las células parenquimatosas. Dentro de las células, los tripomastigotes se diferencian a amastigotes intracelulares pasando por epimastigotes, de transición entre los dos anteriores e igualmente intracelulares. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta que la célula está repleta de parásitos, momento en el que se diferencian de nuevo a tripomastigotes que serán liberados al torrente sanguíneo mediante la lisis celular (Miles, 2017; Rassi Jr. y col., 2012). Estos tripomastigotes se distribuyen por el torrente circulatorio e infectan las células de los tejidos adyacentes, con preferencia por las células musculares cardíacas y digestivas, y se transforman en amastigotes en los nuevos lugares de infección (Barrett y col., 2003; Gállego Berenguer, 2007; Miles, 2017).

El triatomino vector puede volver a alimentarse de sangre de un hospedador que contenga parásitos circulantes. Los tripomastigotes ingeridos por el vector se transforman en epimastigotes en el estómago, se multiplican en el intestino mediano y se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en el intestino grueso del triatomino. Estos tripomastigotes llegan al exterior arrastrados por vía fecal cerrando, de esta manera, el ciclo (de Souza, 2002; Gállego Berenguer, 2007; García y col., 2007).

3. LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

3.1. EPIDEMIOLOGÍA

La prevalencia de la enfermedad no es sólo extremadamente variable entre los diferentes países de América sino también dentro de ellos (Stanaway y Roth, 2015). En la Tabla 2 se muestran los datos de prevalencia y número de infectados por *T. cruzi* según estimaciones basadas en datos recogidos en 2010 por la OMS. De acuerdo con estos datos, un total de 5.742.167 personas están infectadas por *T. cruzi* en 21 países de América Latina (WHO, 2015), lo que supone una reducción importante en el número de infectados en comparación con los 7.694.500 casos estimados por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) según datos recogidos en 2005 (OPS, 2006).

Tabla 2. Prevalencia y número de infectados en los países de América Latina según datos de 2010 (WHO, 2015).

País	Prevalencia (%)	Número de infectados
Argentina	3,64	1.505.235
Belice	0,33	1.040
Bolivia	6,10	607.186
Brasil	0,03	1.156.821
Chile	0,70	119.660
Colombia	0,96	437.960
Costa Rica	0,17	7.667
Ecuador	1,38	199.872
El Salvador	1,30	90.222
Guatemala	1,23	166.667
Guayana Francesa, Guyana y Surinam	0,84	12.600
Honduras	0,92	73.333
Méjico	0,78	876.458
Nicaragua	0,52	29.300
Panamá	0,52	18.337
Paraguay	2,13	184.669
Perú	0,44	127.282
Uruguay	0,24	7.852
Venezuela	0,71	193.339

La epidemiología de la enfermedad de Chagas ha cambiado como consecuencia de los flujos migratorios de América Latina (Gascón y Pinazo, 2008; Pinazo y Gascón, 2015). 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 y emerger también en zonas en donde el vector no está presente convirtiéndose en un problema de salud pública en los países no endémicos (Gascón y col., 2010; Gascón y Pinazo, 2008; Schmunis, 2007; Strasen y col., 2014) (Figura 9).

Estados Unidos es el principal país destino de la emigración procedente de América Latina con aproximadamente 20 millones de latinoamericanos residentes (Gascón y col., 2015). Otros países receptores son Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda (Gascón y col., 2010; Jackson y col., 2014a; Pinto y col., 2014). En Europa, desde el primer caso publicado en 1981 (Pehrson y col., 1981), se han detectado casos en varios países. A partir del año 2000, coincidiendo con el inicio del siglo, el número de casos ha incrementado de manera extraordinaria, sobre todo en España, el país europeo con mayor número de pacientes con Chagas, pero también cabe destacar otros países como Italia, Suiza y Reino Unido (Gascón y col., 2010; 2015; Requena-Méndez y col., 2014; 2015; 2016; Soriano-Arandes y col., 2016).

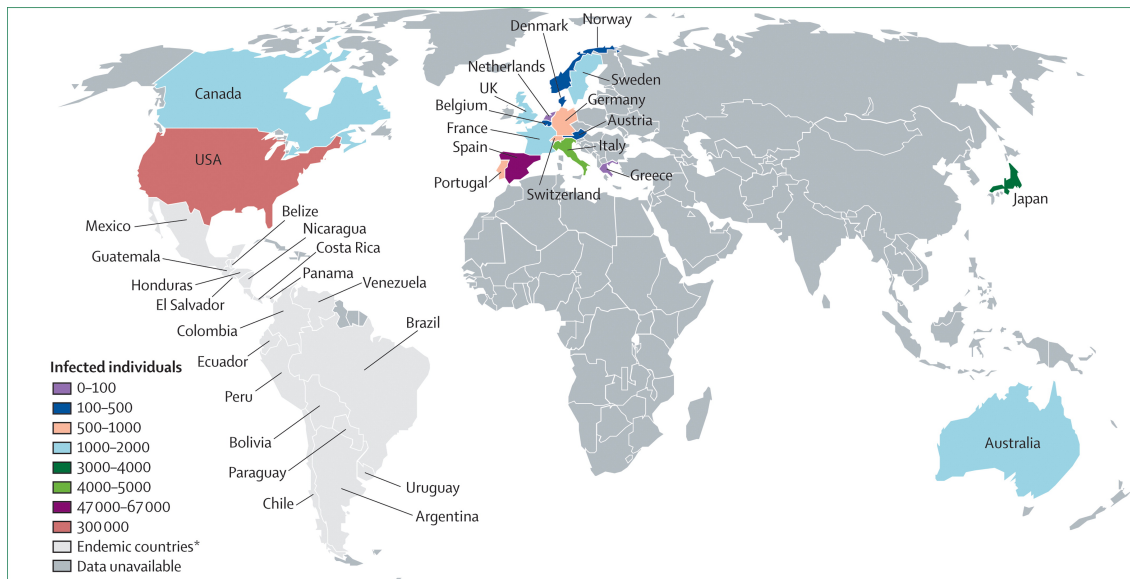


Figura 9. Inmigrantes con infección por *T. cruzi* residentes en países no endémicos (Rassi Jr. y col., 2010).

En Italia, se estiman aproximadamente 6.000 casos de infección por *T. cruzi* (Angheben y col., 2011). Di Girolamo y col. (2016) informaron de una prevalencia del 7,9% en la región de Bolonia. En el caso de Suiza, hasta junio de 2011 se habían diagnosticado 258 casos de enfermedad de Chagas aunque se estima que el número de infectados podría ascender hasta los 3.000 (Jackson y Chappuis, 2011). En el Reino Unido, se estima una prevalencia de entre 1,3 y 2,4% pudiendo llegar hasta los 12.000 casos de infección por *T. cruzi* (Basile y col., 2011a). También se han detectado casos de enfermedad de Chagas pero en menor medida en Francia, Bélgica, Suecia, Alemania, Portugal, Holanda, Austria, Dinamarca, Rumanía y Croacia (Basile y col., 2011a; Pérez-Molina y col., 2011).

3.2. PATOLOGÍA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La patología de la enfermedad de Chagas está relacionada con la fase del ciclo evolutivo en el hospedador humano. Se distinguen dos fases de la enfermedad, aguda y crónica.

3.2.1. FASE AGUDA

El período de incubación a partir de la transmisión vectorial es de entre una y dos semanas y a continuación se inicia la primera fase de la enfermedad de Chagas, la denominada fase aguda (Bern y col., 2011b; WHO, 2015).

En la fase aguda de la infección por *T. cruzi* los síntomas suelen ser ausentes o leves, muy variables o inespecíficos (por ejemplo fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica, entre otros) y tienden a disminuir de manera espontánea hasta desaparecer al cabo de 4–8 semanas (Bern, 2015; WHO, 2012; 2015). Este hecho se puede relacionar con la baja respuesta inmunitaria en esta fase de la enfermedad (Coura y Borges-Pereira, 2010). Por este motivo, la gran mayoría de infecciones agudas no se detectan (Bern, 2015).

En algunos casos, pueden aparecer los denominados signos de puerta de entrada debido a la penetración de los tripomastigotes de *T. cruzi*: edema unilateral de ambos párpados y linfadenitis de los ganglios preauriculares, signo de Romaña, y una reacción del tejido subcutáneo con edema local e induración, congestión vascular e infiltración celular, el chagoma (Miles, 2017; Prata, 2001; Rassi Jr. y col., 2015). En el 5-10% de los casos la fase aguda puede desencadenar problemas graves, como meningoencefalitis y miocarditis, y acabar con la vida del paciente (Bern, 2011; Miles, 2017; Rassi Jr. y col., 2010) (Figura 10).

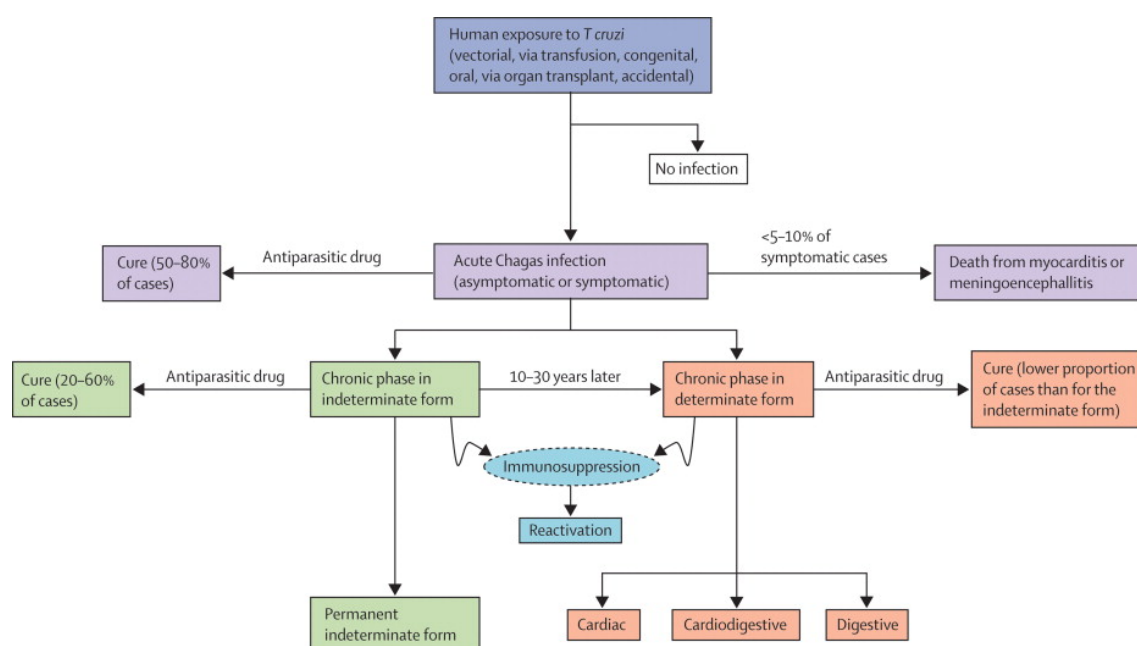


Figura 10. Historia natural de la enfermedad de Chagas en el hombre (Rassi Jr. y col., 2010).

En las personas que superan la fase aguda y que no han sido tratadas, su sistema inmune consigue controlar la multiplicación del parásito y, en consecuencia, la parasitemia se reduce hasta convertirse en prácticamente imperceptible (Flores-Chávez y col., 2007; Bern, 2015; Rassi Jr. y col., 2010; 2015). En este momento se inicia la segunda etapa de la enfermedad de Chagas, la fase crónica.

La infección congénita es una variante de la transmisión de la enfermedad de Chagas en fase aguda con una sintomatología similar (Torrice, 2015). La infección congénita por *T. cruzi* suele ocurrir de manera asintomática en la mayoría de casos y puede progresar a desórdenes cardíacos y/o gastrointestinales años después (Carlier y col., 2015; Cevallos y Hernández, 2014; Grinnage-Pulley y col., 2016). En los casos sintomáticos hay una gran variedad de manifestaciones clínicas, normalmente inespecíficas y que pueden aparecer al nacimiento o días después (Bern y col., 2009; Cevallos y Hernández, 2014). También se relaciona con prematuridad, bajo peso en el nacimiento y muerte fetal (Torrice, 2015). Los casos severos tienen una mortalidad de aproximadamente el 5% y están asociados a miocarditis y meningoencefalitis (Cevallos y Hernández, 2014; Oliveira y col., 2010).

3.2.2. FASE CRÓNICA

En esta fase de la enfermedad los parásitos se ocultan en los tejidos diana, especialmente en el sistema cardíaco y digestivo (WHO, 2015). La mayoría de afectados por la infección por *T. cruzi* permanecen toda la vida en una fase asintomática de la enfermedad denominada fase crónica indeterminada y que sucede inmediatamente después de la fase aguda (Bern, 2015) (ver Figura 10). No obstante, entre 10 y 30 años después de la infección aproximadamente un tercio de los pacientes desarrollarán la fase crónica sintomática de la enfermedad, caracterizada principalmente por problemas cardíacos y digestivos (Bern, 2015; Rassi Jr. y col., 2010; WHO, 2015). La forma cardíaca afecta alrededor del 20-30% de las personas infectadas por *T. cruzi* y sus trastornos principales son arritmias, megalia del corazón (cardiomiopatía), insuficiencia cardíaca, paro cardíaco, etc. (WHO, 2015). La forma digestiva afecta aproximadamente al 10% de los pacientes y provoca lesiones localizadas así como megalias del esófago y el colon (megaesófago y megacolon, respectivamente) (WHO, 2015).

3.2.3. ENFERMEDAD DE CHAGAS E INMUNOSUPRESIÓN

La inmunosupresión modifica la historia natural de la infección por *T. cruzi* en la mayoría de pacientes (Pinazo y col., 2013). Los pacientes infectados por *T. cruzi* con el sistema inmunitario comprometido pueden desarrollar la enfermedad de Chagas en fase aguda debido a la transmisión del parásito o bien padecer una reactivación de la infección crónica ya existente (Bern, 2012; Lattes y Lasala, 2014; Vigliano y col., 2015).

Los pacientes que reciben un órgano de un donante infectado con *T. cruzi* pueden desarrollar la fase aguda de la enfermedad. Estos pacientes tienen el sistema inmune comprometido debido al tratamiento inmunosupresor para el trasplante. Aunque en estos casos el período de incubación puede ser prolongado y los síntomas severos, son infecciones potencialmente curables con el tratamiento antiparasitario adecuado (Bern, 2012). La evaluación pre-trasplante del donante y del receptor, el seguimiento prospectivo del paciente y el diagnóstico precoz son claves para evitar elevadas tasas de mortalidad (Bern, 2012; Lattes y Lasala, 2014).

La enfermedad de Chagas también se puede reactivar en pacientes en fase crónica indeterminada inmunológicamente comprometidos a causa de, por ejemplo, una infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) o fármacos inmunosupresores en individuos trasplantados (Rassi Jr. y col., 2012). También se han descrito casos en pacientes que reciben quimioterapia contra el cáncer (Bern, 2012). Estas reactivaciones pueden ir asociadas a trastornos graves del Sistema Nervioso Central (SNC) como es el caso de la meningoencefalitis (Rassi Jr. y col., 2012).

La reactivación se caracteriza por la multiplicación del parásito en los tejidos de manera similar a como sucede en la fase aguda. Se pueden encontrar tripomastigotes del parásito en sangre y también en el Líquido Cefalorraquídeo (LCR) en los casos de afectación del SNC (de Almeida y col., 2011; Bern, 2012). A veces, la reactivación puede ser totalmente asintomática y sólo la parasitemia indica recurrencia de la infección por *T. cruzi* (Lattes y Lasala, 2014). Los pacientes también pueden padecer manifestaciones clínicas que no son típicas de la enfermedad de Chagas en individuos inmunocompetentes. Además, en unos pocos casos, el tratamiento antitripanocida no surge efecto y pueden aparecer episodios repetidos de reactivación (Bern, 2012).

3.3. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas dependerá de la fase de la infección en la que se encuentra el paciente (aguda o crónica) (Flores-Chávez y col., 2007; Torrico y col., 2011). No obstante, para seguir la evolución del paciente es conveniente realizar tanto la detección del parásito como la de anticuerpos (Flores-Chávez y col., 2007).

3.3.1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Durante la fase aguda hay un gran número de parásitos circulantes en sangre periférica detectables al microscopio mediante métodos parasitológicos (Bern, 2015; WHO, 2002). La observación directa de los tripomastigotes se realiza al microscopio a partir de una gota de sangre fresca en un portaobjetos (Flores-Chávez y col., 2007). También se pueden realizar extensión de sangre periférica y gota gruesa teñidas con el colorante Giemsa para observar las características morfológicas del parásito (WHO, 2002; Murcia y col., 2013). Cuando los niveles de parasitemia son bajos es necesaria la utilización de técnicas de concentración como el método de Strout o el microhematocrito (WHO, 2002). El método de Strout (Strout, 1962) se basa en la concentración de los parásitos a partir de cinco mililitros (mL) de sangre sin anticoagulante. Una vez retraído el coágulo, se recupera y centrifuga el sobrenadante para la posterior observación del sedimento (Vega Chirinos y Náquira Velarde, 2005). Este método se ha utilizado como análisis de rutina en adultos desde hace más de 50 años (Marcipar y Lagier, 2012). Por otro lado, el microhematocrito o micrométodo (Freilij y col., 1983) es una variante del método de Strout que requiere una cantidad menor de sangre mediante el uso de tubos capilares y que se utiliza mayoritariamente para el diagnóstico de la infección congénita (Torrico y col., 2005). Después de la centrifugación, se pueden detectar tres capas macroscópicas en el tubo: glóbulos rojos o eritrocitos, el anillo de glóbulos blancos o leucocitos denominado fracción leucoplaquetaria o buffy coat y el plasma sanguíneo. El micrométodo se basa en el examen microscopio de la línea divisoria entre la placa leucoplaquetaria y el plasma, lugar donde se concentran los tripomastigotes (Torrico y col., 2011).

La diagnóstico de infección congénita por *T. cruzi* en recién nacidos puede realizarse mediante la observación directa del parásito en la sangre venosa del bebé o en el cordón umbilical. En el caso del Chagas congénito, las técnicas de concentración, y

concretamente el microhematocrito, son muy útiles para facilitar la observación de *T. cruzi* en la muestra analizada (Carlier y col., 2011). El líquido amniótico no sirve para el diagnóstico de la infección congénita (Virreira y col., 2006) y la utilidad de la sangre del cordón umbilical genera controversia al poder estar contaminada con sangre de origen materno. No obstante, la extracción de sangre del cordón es un método usado de manera frecuente y que si se realiza correctamente y con cuidado es de gran utilidad en el diagnóstico al ser menos invasivo para el recién nacido (Flores-Chávez y col., 2007).

Existen otros métodos parasitológicos, entre los que destacan el hemocultivo y el xenodiagnóstico (Torrico y col., 2011; WHO, 2002). Ambos métodos requieren de largos períodos de tiempo para obtener los resultados (Marcipar y Lagier, 2012). El hemocultivo (Chiari y col., 1989) permite multiplicar el número de parásitos epimastigotes a partir de un pequeño volumen de sangre inicial mediante los medios de cultivo Novy-McNeal-Nicolle (NNN) y/o Infusión de Hígado y Triptosa (LIT) (Flores-Chávez y col., 2007; Torrico y col., 2011). Por otro lado, el xenodiagnóstico (Brumpt, 1914) consiste en poner en contacto al paciente con triatominos vectores en ayunas, que se alimentan de la sangre del hospedador, y posteriormente analizar las heces u orina de los insectos en busca de tripomastigotes (Flores-Chávez y col., 2007; Schenone, 1999). Existe un método artificial de xenodiagnóstico que evita la exposición directa del paciente al vector (Murcia y col., 2013).

3.3.2. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Las técnicas de biología molecular, especialmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), han abierto nuevas alternativas al diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas (Moser y col., 1989; Sturm y col., 1989; Virreira y col., 2003). Éstas presentan una mayor sensibilidad que las técnicas parasitológicas tradicionales al no depender de personal especialista en la identificación de *T. cruzi* (Ferrer y col., 2013; Flores-Chávez y col., 2007; Pirón y col., 2007). La técnica de la PCR permite obtener un gran número de copias del fragmento de ADN de interés mediante el uso de cebadores que delimitan la amplificación de la zona diana y de la enzima termoresistente Taq (*Thermus aquaticus*) ADN polimerasa (Ferrer, 2015). Posteriormente el producto de la amplificación se puede observar a través de una electroforesis en gel de agarosa con luz ultravioleta (UV) previo tratamiento con un compuesto fluorescente intercalador del ADN como el Bromuro de Etidio (BrEt) o sus

alternativas menos peligrosas SYBR Safe (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos), Red Safe (Chembio Diagnostic Systems, Medford, Nueva York, Estados Unidos), GelRed y GelGreen (Biotium, Fremont, California, Estados Unidos), entre las de otras casas comerciales.

También se ha descrito la PCR Anidada o Nested-PCR (N-PCR) para la detección de *T. cruzi* (Marcon y col., 2002; Ochs y col., 1996). Se trata de una variante de la técnica que comprende dos rondas de amplificación con cebadores diferentes con el objetivo de aumentar la sensibilidad del método. Aunque la sensibilidad mejore también incrementa el riesgo de falsos positivos debido a la posible contaminación por amplicones (Pirón y col., 2007).

La PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR) es una herramienta cada vez más utilizada en los laboratorios y ya se han desarrollado numerosas estrategias (Cummings y Tarleton, 2003; Duffy y col., 2009; 2013; Pirón y col., 2007; Qvarnstrom y col., 2012). En el desarrollo de la técnica se utilizan fluorocromos inespecíficos, que se intercalan entre las bases del ADN (SYBR Green y otros) 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 y que permiten determinar la generación de uno o más productos de amplificación. Ambas estrategias requieren de la excitación del fluorocromo con una determinada longitud de onda y un detector de la señal de fluorescencia (Ferrer, 2015; Schijman, 2015). La medición de la señal fluorescente se realiza después de cada ciclo de amplificación permitiendo observar la reacción del producto en el mismo momento en que se genera. La qPCR tiene otra ventaja respecto a la PCR convencional ya que permite determinar la cantidad de parásito (carga parasitaria) presente en la muestra biológica mediante la realización de curvas patrón con cantidades conocidas de *T. cruzi* obtenidas mediante cultivo. Si bien la sangre es la muestra más utilizada, tanto la PCR como la qPCR se han ensayado también a partir de suero con resultados satisfactorios (Melo y col., 2015; Russomando y col., 1992).

En el caso de la infección congénita, la detección del parásito en sangre mediante PCR puede ayudar a mejorar el diagnóstico precoz de la infección (Bern y col., 2009; Burgos y col., 2009; Schijman y col., 2003;). Se recomienda realizar el diagnóstico por PCR a partir del mes de edad, cuando la carga parasitaria se encuentra en su punto máximo (Bua y col., 2012; 2013; Carlier y col., 2015) y también para evitar falsos positivos

como consecuencia de la transmisión de ADN del parásito de la madre al feto (Carlier y col., 2015).

La dianas moleculares más utilizadas en el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* son la secuencia nuclear repetida del ADNsat (Díaz y col., 1992; Moser y col., 1989; Pirón y col., 2007) y el minicírculo del ADNk, tanto las zonas conservadas como las variables (Ávila y col., 1991; Britto y col., 1993; Qvarnstrom y col., 2012; Sturm y col., 1989; Wincker y col., 1994). Ambas secuencias se encuentran representadas en gran número de copias por genoma y tienen una sensibilidad que puede ser inferior al ADN equivalente a un parásito (Flores-Chávez y col., 2007; Murcia y col., 2013; Schijman, 2015). Estas dianas han sido probadas y aceptadas por estudios internacionales y multicéntricos (Ramírez y col., 2015; Schijman y col., 2011).

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 (Elias y col., 2003; 2005) (Figura 11A). El ADNk contiene un número variable de minicírculos, entre 10.000 y 30.000, que representan su componente más abundante (de Souza, 1999; Ferrer, 2015; Macina y col., 1986; Telleria y col., 2006). El minicírculo de *T. cruzi* contiene cuatro zonas conservadas y cuatro zonas variables lo que amplía considerablemente la cantidad de copias por parásito del fragmento a amplificar (Ferrer, 2015; Ryan y col., 1988) (Figura 11B, C).

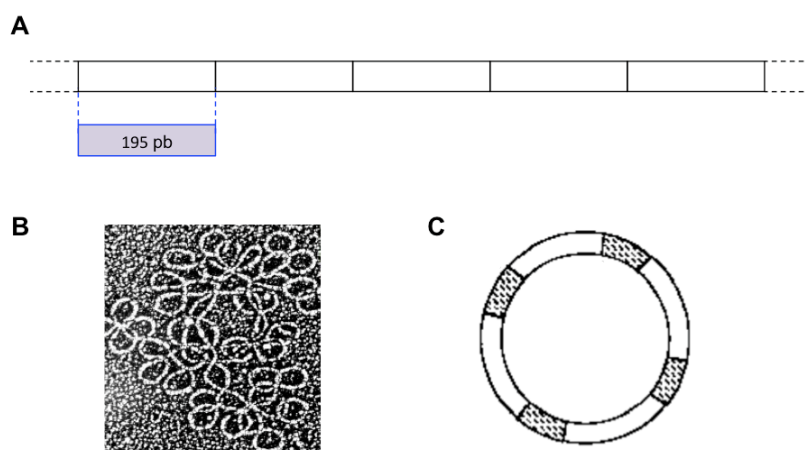


Figura 11. Dianas moleculares más utilizadas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* mediante PCR. Esquema de las repeticiones en tándem del ADNsat (A). Microscopía electrónica de la red de minicírculos del ADNk (B) y esquema del minicírculo con cuatro regiones variables (color blanco) y cuatro regiones conservadas (color negro) (C). Esquema del ADNsat modificado de Schijman (2015), imagen del minicírculo extraída de Schijman (2015) y esquema del minicírculo extraído y modificado de Ryan y col. (1988).

Otro método molecular es la Amplificación Isotérmica de ADN Mediada por Asas (LAMP). Se trata de una metodología desarrollada por Eiken Chemicals Co., Ltd. (Tokio, Japón) que, a diferencia de la PCR, realiza la amplificación del ADN en condiciones isotérmicas (a una única temperatura de 60-65°C) (Notomi y col., 2000). El método utiliza la enzima Bst (*Bacillus stearothermophilus*) ADN polimerasa, con gran actividad de desplazamiento de cadena, y un sistema de cuatro cebadores que reconocen seis secuencias distintas en el ADN diana, dando especificidad a la técnica. También se pueden añadir un par de cebadores extra, denominados “cebadores bucle”, para acelerar la reacción (Ferrer, 2015). Los resultados se obtienen en menos de una hora y no es necesario el uso de un termociclador ni de equipos sofisticados. La metodología LAMP también permite la visualización directa de los resultados mediante discriminación visual. Thekisoe y col. (2007) desarrollaron un LAMP para detectar específicamente diferentes especies dentro del género *Trypanosoma*, entre ellas *T. cruzi*. Actualmente se está validando el Loopamp™ *Trypanosoma cruzi* Detection Kit con diana en el ADN satélite del parásito mediante un convenio de colaboración entre Eiken Chemicals Co., Ltd., Foundation for Innovative Diagnostics (FIND, Génova, Suiza) y el Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh, INGEBI-CONICET, Buenos Aires, Argentina) (Besuschio y col., 2016).

3.3.3. DIAGNÓSTICO INMUNOLÓGICO

En la fase crónica de la infección, la detección del parásito es muy complicada, incluso con técnicas de biología molecular como la PCR, debido a la baja e intermitente parasitemia (Flores-Chávez y col., 2010; Otani y col., 2009). En esta fase crónica se produce una respuesta humoral duradera y estable en el tiempo, principalmente con la presencia de anticuerpos del tipo Inmunoglobulina G (IgG) (Torrico, 2011). Por estos motivos, el diagnóstico durante esta etapa se basa en la detección de anticuerpos específicos IgG anti-*T. cruzi* de fácil detección mediante técnicas serológicas (Murcia y col., 2013; Sánchez-Camargo y col., 2014) (Figura 12).

La primera serología de Chagas se desarrolló poco después de la descripción de la enfermedad, concretamente en 1913 (Gomes y col., 2009; Torrico, 2011). La prueba, basada en la fijación del complemento, fue desarrollada por Guerreiro y Machado (1913) y fue utilizada durante varias décadas.

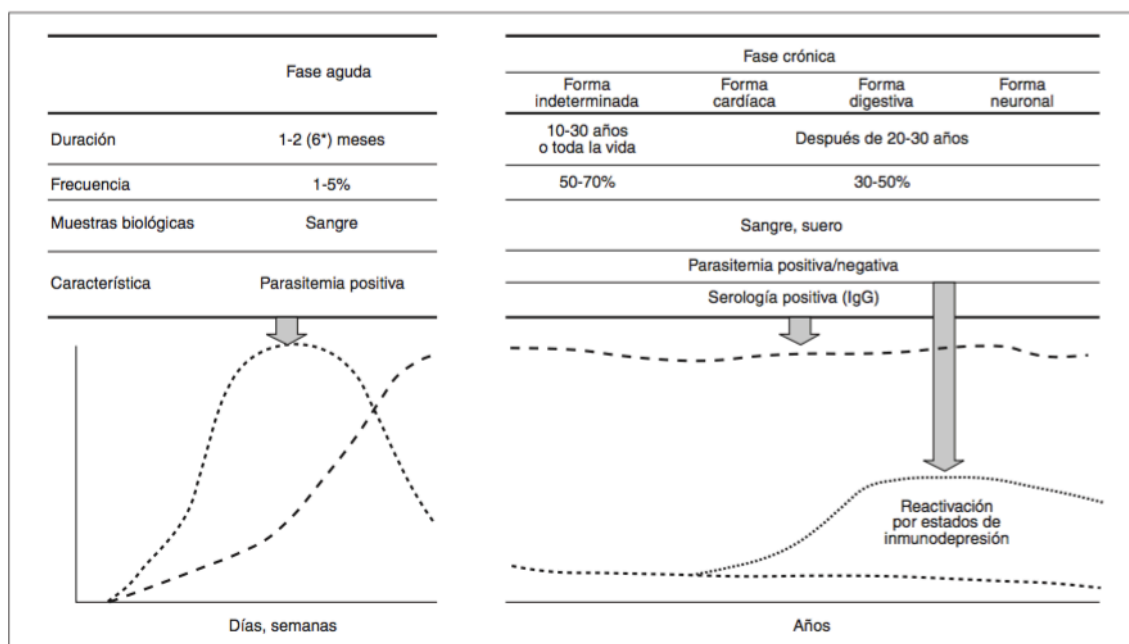


Figura 12. Relación de la dinámica de la parasitemia (línea de puntos) y los anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* en la enfermedad de Chagas (línea discontinua). *La duración de la fase aguda en la infección por transfusión sanguínea puede ser mayor que en la infección natural (Flores-Chávez y col., 2007).

Actualmente no existe una técnica serológica de referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Por este motivo, y según las recomendaciones de la OMS (WHO, 2002), la confirmación de la infección se basa en los resultados coincidentes de cómo mínimo dos técnicas serológicas y en caso de resultados discordantes debe realizarse una tercera técnica. En la práctica clínica es común encontrar un número importante de resultantes discordantes que acaban complicando y aumentando el coste del diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (Lapa y col., 2012; Marcipar y Lagier, 2012).

Las técnicas serológicas también son muy útiles en el diagnóstico y seguimiento de la infección congénita cuando el diagnóstico directo no ha sido concluyente (Carlier y col., 2011), pero debe tenerse en cuenta que los anticuerpos IgG de transmisión materna no desaparecen del recién nacido hasta aproximadamente los nueve meses de edad (WHO, 2002; Carlier y col., 2011; Fumadó y col., 2014; González-Torné y col., 2013). No obstante, la evaluación de la cinética de anticuerpos de la clase IgG durante los primeros meses puede ser de gran utilidad ya que la tendencia a la negativización de estos anticuerpos sugiere ausencia de infección congénita por *T. cruzi* (Flores-Chávez y col., 2007). Por otro lado, la detección de Inmunoglobulinas M (IgM) y/o Inmunoglobulinas

A (IgA), muy útil en el diagnóstico de la toxoplasmosis y de otras enfermedades materno-fetales, no es de utilidad para el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* (Moya y col., 2005). Pueden aparecer resultados falsos positivos ya que estos anticuerpos pueden encontrarse en el recién nacido como respuesta a Antígenos de Excreción-Secreción del parásito (TESA, detallados más adelante en este apartado) que atraviesan la placenta y generan respuesta inmunitaria en el bebé aunque éste no tenga la infección (Rodríguez y col., 2005) o bien por la presencia de anticuerpos tipo factor reumatoide (Moya y col., 2005). También pueden presentar resultados falsos negativos debido a la interferencia de los anticuerpos IgG maternos y a que existe un período ventana hasta la aparición de IgM en concentraciones detectables (Moya y col., 2005).

Los métodos serológicos se pueden dividir en dos grupos según el tipo de antígeno que utilicen. Las técnicas convencionales utilizan todo el parásito o una mezcla compleja de antígenos mientras que las técnicas no convencionales o recombinantes usan proteínas recombinantes, antígenos purificados o péptidos sintéticos (WHO, 2002).

Los métodos convencionales más utilizados son la Hemaglutinación Indirecta (HAI), la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) y los Ensayos Inmunoenzimáticos (ELISA) (Sánchez-Camargo y col., 2014; WHO, 2002). La técnica de HAI (Camargo y col., 1971; Knierim y col., 1973) es rápida y de fácil realización e interpretación pero con una baja sensibilidad (Marcipar y Lagier, 2012; WHO, 2002). La IFI (Camargo, 1966; Fife Jr. y Muschel., 1959) es una alternativa más sensible y económica pero tiene algunas desventajas, como el requerimiento de un microscopio de fluorescencia, la subjetividad de su lectura y la necesidad de personal entrenado (WHO, 2002). Por último, el ensayo ELISA (Voller y col., 1975) es el método más reciente y también el más extendido en el diagnóstico de enfermedades infecciosas (Marcipar y Lagier, 2012). Aunque también requiere personal especializado, la introducción del espectrofotómetro para la lectura de la reacción evita la subjetividad y permite la automatización (Riera y col., 2009; WHO, 2002). Existen tests comercializados de estos métodos como el Chagatest HAI (Wiener Lab, Rosario, Argentina), el Trypanosomiasis IFA test system (Trinity Biotech, Bray Country, Wicklow, Irlanda) y el *T. cruzi* ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, Nueva Jersey, Estados Unidos), entre otros.

Otra técnica que se ha propuesto como un método eficiente de confirmación para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* es el Western-Blot (WB), de especial

importancia cuando las otras técnicas serológicas son discordantes o presentan resultados próximos al punto de corte. Riera y col. (2012) identificaron un patrón de WB para el diagnóstico específico de la infección por *T. cruzi* mediante el uso de antígeno crudo obtenido de cultivo de epimastigotes del parásito.

Los métodos convencionales se caracterizan por tener una elevada sensibilidad pero las reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos, especialmente *Leishmania* spp. y *Trypanosoma rangeli* (no patógeno), representan un reto para el correcto diagnóstico de la enfermedad de Chagas y se suelen relacionar con este tipo de técnicas (Caballero y col., 2007; Guhl y Vallejo, 2003; WHO, 2002). También se han descrito otro tipo de reacciones cruzadas en muestras de pacientes con enfermedades autoinmunes, en individuos que padecen otras enfermedades agudas y en mujeres embarazadas que presentan una importante respuesta policlonal inespecífica (Marcipar y Lagier, 2012).

En los últimos años ha habido un gran avance en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas debido al desarrollo y la comercialización de numerosos ensayos basados en diferentes antígenos del parásito (Balouz y col., 2016; Ferrer, 2015; Flores-Chávez y col., 2010; Guzmán-Gómez y col., 2015). Existen tests comerciales con antígenos recombinantes disponibles: BioELISA Chagas (Biokit, Lliçà d'Amunt, España), Chagas Antibody EIA (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Alemania) y Chagatest ELISA recombinante (Wiener Lab), entre otros.

Los antígenos recombinantes han contribuido a mejorar la especificidad en la detección de la infección por *T. cruzi* aunque el uso de un único antígeno por ensayo no aporta la sensibilidad necesaria (Camussone y col., 2009; da Silveira y col., 2001). La utilización de mezclas de antígenos puede mejorar la sensibilidad (Umezawa y col., 2003; 2004). Precisamente las técnicas de nueva generación, recientemente desarrolladas, combinan el uso de estas mezclas de antígenos recombinantes demostrando elevada precisión. Entre ellas encontramos los Inmuno-ensayos de Micropartículas Quimioluminiscentes (CMIA) Architect Chagas (Abbott Laboratories) (Holguín y col., 2013; Iborra-Bendicho y col., 2012; Praast y col., 2011), Bio-Flash Chagas (Biokit) (Faraudo y col., 2015) y el chip de 12 antígenos dispuesto en placas ELISA denominado Multi-cruzi test (InfYnity Biomarkers, Lyon, Francia) (Granjon y col., 2016).

Los tripomastigotes de *T. cruzi* excretan y secretan una amplia variedad de polipéptidos (Berrizbeitia, 2013). Estos exoantígenos o antígenos metabólicos se denominan Antígenos de Excreción-Secreción (TESA). Se han desarrollado pruebas que utilizan los

antígenos TESA del parásito en formato WB (TESA-Blot) (Nakazawa y col., 2001; Umezawa y col., 1996) y también en formato ELISA (TESA-ELISA) (Nakazawa y col., 2001; Umezawa y col., 2001). El ensayo TESA-Blot se presenta como una muy buena técnica confirmatoria en caso de serologías discordantes (Furuchó y col., 2008; Moure y col., 2016). Actualmente el TESA-Blot, está comercializado por BioMérieux (Río de Janeiro, Brasil) y sólo está disponible en América Latina. Ambos métodos presentan elevadas sensibilidad y especificidad aunque el TESA-ELISA es más apropiado para un número elevado de muestras (Nakazawa y col., 2001). Recientemente, se ha desarrollado un test de detección de nanopartículas en orina basado en TESA (Chunap) para la detección de la infección congénita por *T. cruzi* y que también podría ser útil para la detección precoz de reactivación en pacientes con infección por VIH (Castro-Sesquen y col., 2014; 2016).

Dentro de los antígenos TESA se encuentran los denominados Antígenos Secretados en Fase Aguda (SAPA) que estimulan la producción de anticuerpos detectables principalmente durante la fase aguda de la enfermedad (Berrizbeitia, 2013; Jazín y col., 1991). Estos antígenos SAPA podrían resultar de gran utilidad para el diagnóstico precoz de la infección congénita por *T. cruzi* (Mallimaci y col., 2010; Volta y col., 2015).

Por otro lado, los anticuerpos líticos anti-tripomastigotes o anticuerpos tripanolíticos parecen ser buenos marcadores de infección activa ya que la cantidad de estos anticuerpos disminuye drásticamente si las formas infectivas del parásito desaparecen (Almeida, 2014). La mayoría de anticuerpos líticos tienen como diana epítomos alfa-galactosil, abundantes en la membrana plasmática de los tripomastigotes infectivos de *T. cruzi*, y se denominan anticuerpos anti- α -Gal (Almeida y col., 1993; 1994). Estos anticuerpos son abundantes tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad y se postulan como principales responsables de mantener la baja parasitemia característica de la etapa crónica (Almeida y col., 1991; 1994). Las principales dianas moleculares de los anticuerpos anti- α -Gal son las denominadas *glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored mucin-like glycoproteins of the infective mammalian cell-derived trypomastigote forms* (mucinas-tGPI) (Almeida y col., 1993; 1994). La efectividad del uso de las mucinas-tGPI como antígeno en combinación con un sistema de detección de quimioluminiscencia en formato ELISA (CL-ELISA) se valoró en zona endémica

(Almeida y col., 1997; de Marchi y col., 2011) y no endémica (Izquierdo y col., 2013) con muy buenos resultados.

También están disponibles en el mercado tests de diagnóstico rápido para la infección por *T. cruzi* que suelen basarse en los principios de inmunocromatografía, aglutinación de partículas, inmunofiltración e inmunodot. Estos tests suelen usar sangre periférica, suero o plasma, dan resultados cualitativos o semicuantitativos y se caracterizan por la obtención rápida de los resultados sin necesidad de ningún equipo eléctrico (Flores-Chávez y col., 2012; Flévaud y col., 2016; Sánchez-Camargo y col., 2014). La falta de sensibilidad suele ser el problema principal de los tests rápidos aunque pueden ser de gran utilidad en zonas endémicas rurales en donde el acceso al sistema de salud es complicado (Brasil y col., 2010). Hacen falta estudios exhaustivos de los kits recientemente comercializados.

3.4. TRATAMIENTO

Actualmente no existe una vacuna preventiva o terapéutica efectiva disponible para la enfermedad de Chagas (Quijano-Hernández y Dumonteil, 2011). Los dos únicos fármacos con eficacia probada contra *T. cruzi* en humanos son el Benznidazol (BNZ) y el Nifurtimox (NFX), ambos desarrollados a principios de los años 70 (Bern y col., 2007; Bermúdez y col., 2016).

3.4.1. BENZNIDAZOL Y NIFURTIMOX

El BNZ es un compuesto del grupo de los nitroimidazoles con efecto tripanocida (Castro y col., 2006). El fármaco actúa uniéndose de forma covalente a las macromoléculas de *T. cruzi* provocando daños a nivel del ADN parasitario (Apt y col., 2008). El NFX es un análogo de nitrofuranos que también presenta acción tripanocida. El medicamento tiene la capacidad de generar productos de reducción de oxígeno formando radicales altamente tóxicos que provocan un estrés oxidativo al parásito al ser éste deficiente en mecanismos de detoxificación (Apt y col., 2008).

Aunque la tolerancia al fármaco varía en función del paciente, la mayoría de expertos prefieren utilizar primero el BZN como tratamiento debido a que, en general, presenta mejor tolerancia. Si el tratamiento con uno de los fármacos debe interrumpirse se puede

utilizar el otro como alternativa (Bern y col., 2007). Ambos fármacos comparten algunas características como mayor tolerancia en los niños, eficacia superior durante la fase aguda de la enfermedad, mayor grado de toxicidad en adultos y diferente susceptibilidad entre las diferentes UDTs de *T. cruzi* (Bermúdez y col., 2016). El tratamiento durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas, ya sea con BZN o con NFX, tiene una elevada eficacia. Los síntomas se reducen, la parasitemia se vuelve indetectable en un período más corto de tiempo y entre el 60 y el 85% de los individuos tratados llegan a eliminar el parásito del organismo (Bern, 2011). En el caso de la infección congénita, el tratamiento durante el primer año de vida supone una efectividad de prácticamente el 100% (WHO, 2012).

El tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo se recomienda de manera universal en los casos agudos y en niños menores de 14 años (Viotti y col., 2014). No obstante, la OMS (WHO, 2002) también recomienda el tratamiento a todos los pacientes en fase crónica excepto en el caso de las mujeres embarazadas o en fase de lactancia (posible efecto teratogénico) (Carlier y col., 2012) y en pacientes con insuficiencia renal y hepática. En la práctica clínica, la inclusión del tratamiento en los pacientes en fase crónica es un tema controvertido y más aún después de la publicación de los resultados del estudio BENEFIT (Morillo y col., 2015), en el que no se observaron diferencias significativas en la progresión clínica de la enfermedad entre los pacientes con cardiomiopatía chagásica tratados con BNZ y el grupo placebo aunque sí en la detección de la carga parasitaria (Morillo y col., 2015; Pecoul y col., 2016).

Los efectos adversos de ambos fármacos pueden ser graves y obligar a interrumpir el tratamiento (Apt y col., 2008). Por el contrario, el tratamiento suele completarse con éxito y sin efectos secundarios durante el primer año de vida (Altcheh y col., 2011; Carlier y col., 2011). El BNZ puede dar lugar a efectos secundarios dermatológicos como dermatitis alérgica, edema generalizado, fiebre, mialgia y artralgia, hematológicos como trombocitopenia, neutropenia y agranulocitosis y de compromiso neurológico con síntomas como neuropatía periférica, parestesia e insomnio (Apt y col., 2008; Bermúdez y col., 2016; Castro y col., 2006). Los efectos adversos más comunes del NFX son anorexia y pérdida de peso, manifestaciones gastrointestinales como náuseas, vómitos y dolor abdominal pero algunos pacientes también pueden desarrollar dermatitis y compromiso del SNC con síntomas como insomnio, parestesia, dolor de cabeza, mareo,

vértigo, confusión y psicosis (Apt y col., 2008; Bermúdez y col., 2016; Castro y col., 2006).

3.4.2. PERSPECTIVAS DE FUTURO

Actualmente, existe una urgente y clara necesidad de mejorar el tratamiento con nuevos fármacos eficaces contra el parásito y seguros para el paciente. Sin embargo, el proceso de descubrimiento y creación de nuevos fármacos es complicado lo que obstaculiza la obtención de un mejor tratamiento para la infección por *T. cruzi* (Chatelain, 2015). Recientemente se han descartado dos fármacos candidatos de la clase de los azoles como monoterapia para tratar la enfermedad de Chagas: Posaconazol (Molina y col., 2014; Pinazo y col., 2010) y el profármaco de Ravuconazol, E1224 (Torricono, 2013; Torricono y col., 2014). Ambos candidatos presentan actividad anti-tripanosoma pero no son capaces de erradicar el parásito (Chatelain, 2015; Gaspar y col., 2015; Molina y col., 2016). Otro fármaco que está siendo evaluado es el Fexinidazol pero se ha interrumpido la inclusión de pacientes en el estudio por problemas de seguridad (Molina y col., 2016). En este contexto, los ensayos clínicos actuales se centran en nuevos medicamentos y en estrategias de combinación de fármacos (Gascón, 2016).

3.4.3. MARCADORES DE EFICACIA TERAPÉUTICA

En la fase crónica la eficacia del tratamiento es difícil de comprobar debido a la falta de un método fiable que sirva como marcador de cura (Bern, 2011; Pinazo y col., 2014). Hasta el momento el único criterio aceptado es la seroreversión o negativización de la serología y el tiempo necesario para alcanzar este resultado puede llegar a los 20 años (Molina y col., 2016; Pinazo y col., 2015). Los biomarcadores son sustancias, estructuras o procesos que pueden ser medidos en el cuerpo o en sus productos y que permiten predecir el progreso de la enfermedad y el efecto del tratamiento (Pinazo y col., 2015). Pinazo y col. (2016) sugieren que una actividad procoagulante regulada en el plasma de pacientes con infección por *T. cruzi* podría ser utilizada como un biomarcador potencial de respuesta terapéutica en pacientes en la fase crónica de la enfermedad.

También se ha propuesto la PCR como marcador de falla terapéutica. Un resultado de PCR positivo posterior al tratamiento indica la presencia de parásitos circulantes y, por

tanto, la ineficacia del tratamiento. Además se podría detectar de forma más temprana que mediante técnicas serológicas. Es importante tener en cuenta que un resultado de PCR negativo posterior al tratamiento no significa cura, sólo indica que no se puede detectar carga parasitaria en la muestra del paciente (Schijman, 2015).

3.5. CONTROL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Debido a la ausencia de una vacuna y de quimioprofilaxis eficaces, el control de la infección por *T. cruzi* se basa en evitar la transmisión (Magill y Reed, 2000; Miles, 2003). La enfermedad de Chagas no se puede erradicar a causa de la gran cantidad de escenarios que juegan un papel clave en la aparición de nuevos casos. Por este motivo, la interrupción de la transmisión se convierte en la herramienta más eficaz para eliminar el Chagas como problema de salud pública (Sosa-Estani, 2015).

Las estrategias de control deben combinar dos grandes líneas de acción: la prevención de la transmisión para evitar la aparición de nuevos casos y el diagnóstico y tratamiento de los pacientes afectados por la enfermedad para recuperar la salud, cuando sea posible, y también para cortar la cadena de transmisión por vía sanguínea eliminando la capacidad infectiva de los donantes y de las madres para la potencial transmisión por transfusiones, trasplantes de órganos así como la vía vertical, respectivamente (Sosa-Estani y Segura, 2015).

Los Ministerios de Salud de los países de América Central y del Sur, con la ayuda de la OPS y la OMS, han creado iniciativas de control de la enfermedad de Chagas. Estas iniciativas tienen objetivos similares: interrumpir la transmisión vectorial mediante fumigaciones con insecticidas de acción residual, controlar las muestras de sangre para transfusiones y cribar a las madres para evitar la infección congénita y tratar a los recién nacidos cuando sea necesario (Coura y col., 2014; Liu y Zhou, 2015; Moncayo, 2006; Moncayo y Silveira, 2009).

En las zonas no endémicas, son pocos los países que han tomado consciencia del problema global que supone la enfermedad de Chagas y que hayan establecido cambios en sus sistemas de salud. Para hacer frente al problema, las prioridades deben ser los programas de control para evitar nuevos casos por transmisión vertical, transfusión de sangre o trasplante de órganos (Pinazo y Gascón, 2015).

3.5.1. CONTROL VECTORIAL

En 1991 se creó la Iniciativa de los países del Cono Sur (INCOSUR) integrada por Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay (Coura, 2013; Guhl, 2007). En estos países el principal vector de la enfermedad es *T. infestans*, con hábitos exclusivamente domiciliarios (Moncayo, 2006). Gracias a la creación de este proyecto multinacional, se ha reducido considerablemente la incidencia de la enfermedad en estos países y Uruguay, Chile, Brasil y Paraguay fueron declarados libres de transmisión vectorial, por *T. infestans*, en 1997, 1998, 2006 y 2016, respectivamente (Coura, 2013; Moncayo, 2006; Moncayo y Silveira, 2009; Paraguay.com). También se ha conseguido interrumpir la transmisión por este vector en ocho provincias de Argentina (2001-2013) y los Departamentos de La Paz y Potosí en Bolivia (2011-2013) (OPS/WHO, 2014).

En 1997 nació la Iniciativa de los Países Andinos (IPA) formada por Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela (Coura, 2013; Guhl, 2007). Debido a la gran diversidad ecológica, en esta zona hay gran diversidad de vectores (Coura, 2013). En la Región Andina se ha logrado interrumpir la transmisión por *T. infestans* en los Departamentos de Tacna y Moquegua en Perú y en 10 municipios de los Departamentos de Casanare, Boyacá, Santander y Arauca en Colombia (2013) (OPS/WHO, 2014).

En 1998 se creó una Iniciativa de los países de Centro América y Méjico con Belice, Costa-Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá (Coura, 2013; Guhl, 2007). Los principales vectores en estos países son *R. prolixus* y *T. dimidiata* (Moncayo, 2006). La transmisión por *R. prolixus* fue interrumpida en Guatemala (2008), El Salvador (2010), Honduras (2010), Nicaragua (2010), Costa Rica y Belice (2010) y se caracterizó la transmisión extradomiciliaria desde el ciclo selvático en Panamá (2013). En Méjico, la eliminación de *R. prolixus* ha sido certificada en Chiapas y Oaxaca (OPS/WHO, 2014).

Finalmente, en 2004 se creó la Iniciativa Amazónica (AMCHA) formada por Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guyana, Guayana Francesa, Perú, Surinam y Venezuela (Coura, 2013; Guhl, 2007). En estos países se está dando respuesta a los brotes de Chagas transmitido por alimentos (OPS/WHO, 2014).

En los países no endémicos no existe la transmisión vectorial pero Estados Unidos no puede ser considerado estrictamente zona no endémica debido a que en la mitad sur del país hay transmisión activa de *T. cruzi* en reservorios domésticos y selváticos y se han

encontrado 11 especies diferentes de triatomíneos (Bern y col., 2011a; Gascón y col., 2010). En estas zonas se han detectado esporádicamente casos humanos autóctonos de enfermedad de Chagas describiéndose el primero en 1955 (Bern y col., 2011a; Gascón y col., 2015). En el período 1955-2015 el número de casos autóctonos identificados en los Estados Unidos asciende hasta un total de 28 (Montgomery y col., 2016). Recientemente, se ha descrito el primer caso de transmisión autóctona en la zona de Los Angeles (California) (Hernández y col., 2016). La baja tasa de transmisión en esta zona probablemente es debida al mejor estado de las viviendas, dificultando la domiciliación de los vectores, y a la subestimación de casos (Gascón y col., 2015).

3.5.2. CONTROL TRANSFUSIONAL

En los países endémicos, la transfusión de sangre fue considerada la segunda causa más frecuente de adquirir la infección por *T. cruzi* (Angheben y col., 2015). Por este motivo, se han implementado medidas para prevenir la transmisión del parásito por transfusión basadas en el control de los bancos de sangre (Sosa-Estani y Segura, 2015). La cobertura de detección en los bancos de sangre ha alcanzado progresivamente el 100% en muchos países en los últimos 20 años y el riesgo de transmisión por transfusión ha disminuido de manera drástica (Angheben y col., 2015; Miles, 2017). Sin embargo, cabe destacar que en el caso de México, el país latinoamericano con menor cobertura de detección, se han descrito casos de enfermedad de Chagas debidos a transmisión transfusional y se han hecho esfuerzos para aumentar la cobertura de cribado en donantes de sangre al 92% en 2012 (Angheben y col., 2015; Rojo Medina, 2014).

La mayoría de países pertenecientes a la Unión Europea siguen las directivas 2004/33/CE y 2006/17/CE sobre la seguridad y calidad de la sangre en las que el antecedente de la enfermedad de Chagas es un criterio de exclusión permanente de los donantes de sangre (Requena-Méndez y col., 2014). No obstante, sólo España, Francia y Reino Unido han establecido un cribado de la infección por *T. cruzi* previo a la donación. Suecia excluye a los donantes que hayan vivido más de cinco años en zonas endémicas de la enfermedad de Chagas e Italia y Portugal se encuentran en proceso de cambiar sus protocolos. En España existe una normativa de cribado (Gascón y col., 2015; Requena-Méndez y col., 2014). En el resto de países europeos sólo se excluye al donante mediante un cuestionario previo a la donación de sangre (Gascón y col., 2015).

Estados Unidos, Canadá, Australia y Japón incluyen la infección por *T. cruzi* en los cuestionarios de los bancos de sangre y los Estados Unidos tienen, además, establecido un sistema de cribado de la enfermedad (Gascón y col., 2015).

3.5.3. CONTROL EN EL TRASPLANTE DE ÓRGANOS

El control de la infección por *T. cruzi* en el trasplante de órganos es muy importante en América Latina debido a la elevada prevalencia de la enfermedad crónica en los donantes y es de especial relevancia en los países endémicos que realizan trasplante de corazón como Brasil, Argentina, Colombia, Chile, México, Uruguay, Perú, Paraguay y Ecuador (Kransdorf y col., 2014).

El trasplante de órganos es más frecuente en países no endémicos que en los endémicos, y la nueva era del trasplante de órganos ha abierto otra vía de transmisión de la enfermedad de Chagas (Pinazo y Gascón, 2015). Normativas vigentes que establezcan de manera específica el cribado de la infección por *T. cruzi* al donante y al receptor de un órgano sólido son casi inexistentes en los países no endémicos (Gascón y col., 2015). En Estados Unidos, en 2011 se elaboraron unas recomendaciones para el cribado de la enfermedad de Chagas en los trasplantes de órganos (Chin-Hong y col., 2011). En Europa, sólo Italia, España y Reino Unido incluyen a *T. cruzi* en las guías nacionales de trasplante de órganos (Requena-Méndez y col., 2014).

3.5.4. CONTROL DE LA TRANSMISIÓN CONGÉNITA

El principal reto actual de los países no endémicos es el control de la transmisión vertical al ser este el principal mecanismo de contagio en estas zonas (Buekens y col., 2008; Gascón y Pinazo, 2008; Oliveira y col., 2010; Portús, 2010).

Con el objetivo de prevenir la transmisión vertical, algunos territorios europeos han implementado programas de cribado oficiales de las mujeres embarazadas latinoamericanas y sus hijos (Requena-Méndez y col., 2014). Este es el caso de la región de la Toscana en Italia (Consiglio Regionale Regione Toscana, 2012) y de algunas comunidades autónomas de España (Requena-Méndez y col., 2014; Soriano-Arandes y col., 2016). Aunque en algunos países de la Unión Europea existen iniciativas locales, en la mayoría de zonas no se han implementado protocolos oficiales

para el cribado de la enfermedad de Chagas congénita (Gascón y col., 2014; Requena-Méndez y col., 2014) (Figura 13).

En otros países no endémicos y no europeos no existen programas de cribado de la infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas procedentes de América Latina (Gascón y col., 2015; Jackson y col., 2014a).

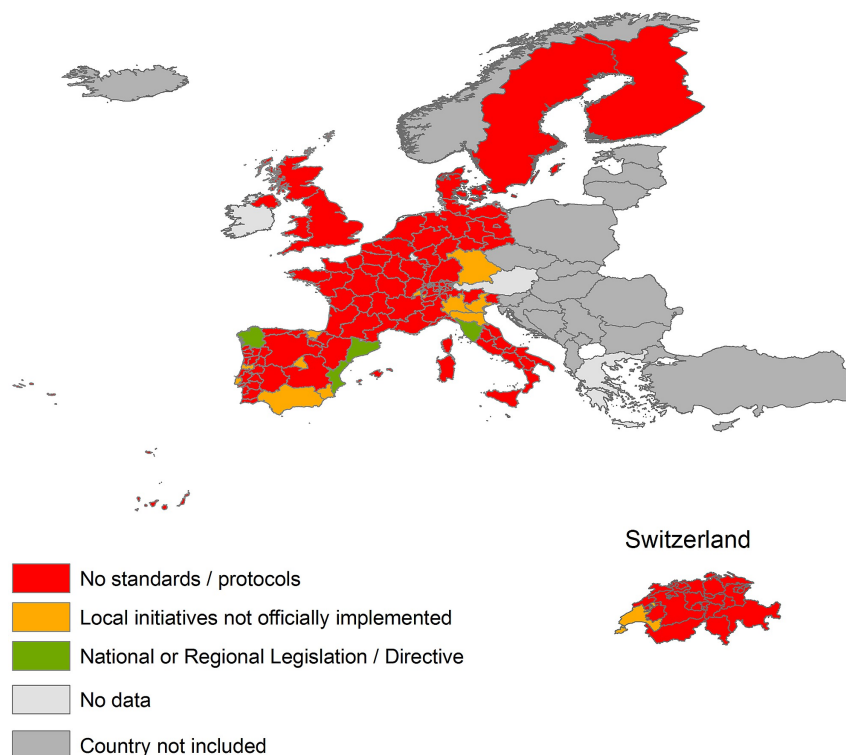


Figura 13. Control de la transmisión congénita de la infección por *T. cruzi* en los países de la Unión Europea y Suiza (Requena-Méndez y col., 2014).

3.6. ENFERMEDAD DE CHAGAS EN ESPAÑA

España no sólo es el país con la tasa de inmigración latinoamericana más elevada de Europa (Roca y col., 2011; Schmunis, 2007) sino también es el país con mayor prevalencia de la enfermedad de Chagas en la población procedente de países endémicos (Basile y col., 2011a; Herrador y col., 2015). Según Sicuri y col. (2011), 1,7 millones de inmigrantes procedentes de América Latina viven en España, en donde se estima que 42.173 adultos están infectados por *T. cruzi* (Navarro y col., 2012). Las tasas de prevalencia en migrantes procedentes de América Latina descritas en diferentes estudios realizados en unidades de medicina tropical y centros de salud internacional

españoles es de entre 15,9 y 41% (Manzardo y col., 2008; Muñoz y col., 2009b; Navarro y col., 2011; Pérez-Ayala y col., 2011) llegando hasta el 65% en el caso de los pacientes de origen boliviano, la comunidad más afectada por la infección por *T. cruzi* (Muñoz y col., 2009b). Dichos datos pueden ser sobreestimados ya que los estudios de prevalencia de la enfermedad de Chagas suelen realizarse en centros especializados a los que son referidos los pacientes previamente diagnosticados por otros centros (Navarro y col., 2012).

En referencia a la prevalencia en los bancos de sangre, los resultados oscilan entre 0,05 y 1,38% en estudios realizados en diferentes regiones del país (Abalo y col., 2007; Castro, 2006; Ontañón y col., 2007). Pirón y col. (2008) informaron de una prevalencia del 0,62% en donantes de sangre latinoamericanos en Cataluña, con valores superiores en el caso de los donantes procedentes de Bolivia (10,2%). Posteriormente, Cancino-Faure y col. (2015) obtuvieron una prevalencia del 1,91% en la población donante latinoamericana en las Islas Baleares y 16,03% en el caso de los donantes de sangre bolivianos. Varios autores han descrito casos de infección por transfusión en España (Benjamin y col., 2012; Flores-Chávez y col., 2008b; Forés y col., 2007; Pérez de Pedro y col., 2008). En el año 2005 se implementó un cribado serológico obligado en los bancos de sangre, recogido en el RD1088/2005, en el que se requiere la exclusión o el cribado de los donantes nacidos en países endémicos, hijos o nietos de madres nacidas en estos países y donantes que hayan residido o hayan sido transfundidos en estas zonas (Benjamin y col., 2012). El Plan nacional de sangre de cordón umbilical del año 2008 también recomienda el cribado de la enfermedad de Chagas en estas muestras (Gobierno de España, 2009; Roca Saumell y col., 2015).

En España, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) elaboró en el año 2004 unas recomendaciones especiales sobre el cribado serológico de la infección por *T. cruzi* previo al trasplante de órganos sólidos. Tan solo hemos podido recoger un caso de transmisión por trasplante de hígado, en 2008, en España (Rodríguez-Guardado y col., 2015). A diferencia de los casos referidos por Salvador y col. (2011), no se conoció la condición de donante seropositivo hasta transcurridos 10 meses del trasplante.

Aproximadamente el 50% de la población inmigrante latinoamericana en España corresponde a mujeres asintomáticas y en edad fértil, incrementando el riesgo de transmisión vertical de la enfermedad (Navarro y col., 2012; Pérez-Ayala y col., 2011; Portús, 2010). Sicuri y col. (2011) estimaron la posibilidad de que alrededor de 1750

recién nacidos sean infectados por *T. cruzi* en los próximos 10 años. Varios autores han descrito casos de infección congénita en nuestro entorno (Carrilero y col., 2009; Flores-Chávez y col., 2008a; Fumadó y col., 2014; Guarro y col., 2007; Muñoz y col., 2007; 2009a; Riera y col., 2006). Los porcentajes de prevalencia obtenidos en mujeres embarazadas latinoamericanas en varios estudios realizados varían entre 1,3 y 12%, con porcentajes más elevados entre las mujeres de origen boliviano. En referencia a las tasas de transmisión vertical, éstas oscilan entre 0 y 7,3% (Ávila Arzanegui y col., 2013; Barona-Vilar y col., 2012; Flores-Chávez y col., 2011; Muñoz y col., 2009a; Muñoz-Vilches y col., 2012; Ortí Lucas y Parada Barba, 2009; Otero y col., 2012; Patricio-Talayero y col., 2008; Ramos y col., 2012) (Tabla 3).

Tabla 3. Prevalencia y tasa de transmisión vertical en mujeres embarazadas latinoamericanas en estudios realizados en diferentes regiones de España.

Región	Prevalencia total (%)	Prevalencia mujeres bolivianas (%)	Transmisión vertical (%)	Referencia
Almería	1,5	ND	0	Muñoz-Vilches y col., 2012
Barcelona	3,4	ND	7,3	Muñoz y col., 2009a
Barcelona	3,5	14,5	5	Otero y col., 2012
Elche	1,3	10,3	0	Ramos y col., 2012
Madrid	4,0	11,4	2,6	Flores-Chávez y col., 2011
Valencia y Alicante	4,8	17,5	0	Patricio-Talayero y col., 2008
Valencia	9,7	26	2,7	Ortí Lucas y Parada Barba, 2009
Valencia	11,4	34,1	3,7	Barona-Villar y col., 2012
Vizcaya	12	22,2	5,8	Ávila Arzanegui y col., 2013

ND: Datos no disponibles.

Las comunidades autónomas de Cataluña, Galicia y Valencia son las únicas regiones españolas que han implementado estrategias oficiales de prevención de la infección congénita y que incluyen algoritmos de diagnóstico del recién nacido (Basile y col., 2011b; Generalitat de Catalunya, 2010; Generalitat Valenciana, 2009; Xunta de Galicia, 2014). En el caso de Andalucía (Junta de Andalucía, 2014) y el País Vasco (Gobierno Vasco, 2008) se recomienda el cribado de las mujeres embarazadas susceptibles a la

enfermedad. Por otro lado, Madrid y Murcia tienen iniciativas locales de control de la transmisión congénita pero no presentan una normativa oficial (Flores-Chávez y col., 2011; Herrador y col., 2015; Merino y col., 2013).

II. HYPOTHESIS, OBJECTIVES AND WORK PLAN

II. HYPOTHESIS, OBJECTIVES AND WORK PLAN

1. HYPOTHESIS

A plethora of tests for the diagnosis of Chagas disease are available, most of them serological, but their usefulness in different population groups, phases of infection and the follow-up of the disease is still not established. A new generation of tests with potentially improved accuracy has been developed recently. The considerable differences among the published results of studies evaluating serological tests have impeded an international consensus on an optimal method. The current protocols provide inconsistent results and involve the analysis of a large number of samples by several serological tests, resulting in fairly high costs and pressure on healthcare budgets.

The problems of parasitological techniques are low sensitivity and high subjectivity because they depend on the ability and training of the observer to detect the parasite in the blood samples. On the other hand, serological diagnosis has the inconvenience of the high persistence of immunoglobulin G (IgG) antibodies in chronic patients and the detection of passive IgG of maternal origin in newborns of Chagas-infected women.

Finally, the molecular characterization of *T. cruzi* has sought to identify associations between Discrete Typing Units (DTUs) and the clinical development of the disease. There are dozens of different molecular markers but to date there is no consensus on a protocol.

2. OBJECTIVES

The main aim of the present work was to assess the usefulness of several serological techniques used for the diagnosis and follow-up of chronic and congenital *Trypanosoma cruzi* infection and to characterize *T. cruzi* genotypes in a Latin American population attending hospitals in the Barcelona area (Spain).

The specific objectives of the study are:

1. To assess and compare different serological techniques for the diagnosis of chronic and congenital Chagas disease.
2. To establish cost-effective diagnostic algorithms according to the stage of the disease (chronic and congenital).
3. To evaluate different approaches for the characterization of *T. cruzi* genotypes in a population of migrants from Chagas disease endemic countries and newborns.

3. WORK PLAN

Presented here is the work plan carried out to fulfill the objectives of this study, which includes:

1. Study of the adult population.
 - a. Retrospective selection and collection of the samples to be analyzed.
 - b. Performance of the selected serological tests.
 - c. Analysis of results.
 - d. Proposal of a new algorithm for the serological diagnosis of chronic Chagas disease.
2. Study of neonates and pediatric cases.
 - a. Retrospective selection of the newborns and collection of the follow-up samples to be analyzed.
 - b. Performance of the qPCR and the selected serological tests.
 - c. Analysis of results and comparison with the official programs implemented by European health authorities to prevent vertical transmission.
 - d. Proposal of a new strategy for the diagnosis of congenital *T. cruzi* infection.
3. Identification of *T. cruzi* DTUs.
 - a. Retrospective selection of the samples to be analyzed.
 - b. Performance of the molecular tests for the inclusion criteria (kDNA and SatDNA qPCRs).

- c. Selection of positive samples to be submitted to DTU characterization by different approaches.
- d. Analysis of results.
- e. Determination of the utility of each method.

III. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is
it time for a change

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA:
¿ES EL MOMENTO DE UN CAMBIO?

Alba Abras, Montserrat Gállego, Teresa Llovet, Silvia Tebar, Mercedes Herrero, Pere Berenguer, Cristina Ballart, Carmen Martí, Carmen Muñoz

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2016, Vol. 54, p. 1566-1572

Factor de impacto: 3,631

RESUMEN

La enfermedad de Chagas se ha extendido a áreas que no son endémicas de la enfermedad con la migración humana. Debido a que no está disponible ningún test estándar de referencia, el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas crónica requiere al menos dos tests. Las técnicas de nueva generación han mejorado significativamente la precisión del diagnóstico de la enfermedad de Chagas mediante el uso de una gran mezcla de antígenos recombinantes y diferentes sistemas de detección, como la quimioluminiscencia. El objetivo del presente estudio fue evaluar la precisión global de un kit de nueva generación, el Architect Chagas (punto de corte, ≥ 1 unidad relativa de luz/punto de corte [S/CO]), como única técnica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica. Architect Chagas mostró una sensibilidad del 100% (Intervalo de Confianza [IC] del 95%, 99,5-100%) y una especificidad del 97,6% (IC 95%, 95,2-99,9%). Cinco de las seis muestras de suero con un resultado falso positivo fueron consecuencia de la reactividad cruzada con *Leishmania* spp., y todas ellas obtuvieron resultados < 5 S/CO. Proponemos a Architect Chagas como única técnica para el cribado en bancos de sangre y para el diagnóstico de rutina en laboratorios clínicos. Sólo tendrían que confirmarse mediante un segundo ensayo serológico los sueros en zona gris y los positivos con resultados ≤ 6 S/CO, evitando así los sueros falsos positivos y el problema de la reactividad cruzada con las especies de *Leishmania*. La aplicación de esta propuesta resultaría en importantes ahorros en el coste del diagnóstico de la enfermedad de Chagas y por lo tanto en la gestión y el control de la enfermedad.



Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change?

Alba Abras,^{a,b} Montserrat Gállego,^{a,b} Teresa Llovet,^{c,d} Silvia Tebar,^{a,b} Mercedes Herrero,^{c,d} Pere Berenguer,^{c,d} Cristina Ballart,^{a,b} Carmen Martí,^e Carmen Muñoz^{c,d,f}

Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain^a; ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Barcelona, Spain^b; Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain^c; Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain^d; Unitat de Microbiologia, Hospital General de Granollers, Granollers, Spain^e; Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain^f

Chagas disease has spread to areas that are nonendemic for the disease with human migration. Since no single reference standard test is available, serological diagnosis of chronic Chagas disease requires at least two tests. New-generation techniques have significantly improved the accuracy of Chagas disease diagnosis by the use of a large mixture of recombinant antigens with different detection systems, such as chemiluminescence. The aim of the present study was to assess the overall accuracy of a new-generation kit, the Architect Chagas (cutoff, ≥ 1 sample relative light units/cutoff value [S/CO]), as a single technique for the diagnosis of chronic Chagas disease. The Architect Chagas showed a sensitivity of 100% (95% confidence interval [CI], 99.5 to 100%) and a specificity of 97.6% (95% CI, 95.2 to 99.9%). Five out of six false-positive serum samples were a consequence of cross-reactivity with *Leishmania* spp., and all of them achieved results of < 5 S/CO. We propose the Architect Chagas as a single technique for screening in blood banks and for routine diagnosis in clinical laboratories. Only gray-zone and positive sera with a result of ≤ 6 S/CO would need to be confirmed by a second serological assay, thus avoiding false-positive sera and the problem of cross-reactivity with *Leishmania* species. The application of this proposal would result in important savings in the cost of Chagas disease diagnosis and therefore in the management and control of the disease.

Chagas disease, or American trypanosomiasis, is a parasitic infection traditionally linked to rural areas of Latin America (1). Based on 2010 data, an estimated 5,742,167 people are infected in 21 Latin American countries (2). The epidemiology of Chagas disease has changed because of migratory trends, and it is now an emerging public health problem in the United States and Europe (3, 4), notably in Spain, the European country with the largest number of immigrants from Latin America (3, 5).

The flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi* is mainly transmitted in areas endemic for the disease through contact with the dejections of blood-feeding triatomine bugs (6, 7) and more rarely by oral transmission through contaminated food (8, 9). The infection may also occur in both areas that are endemic and nonendemic through blood transfusion (10), organ transplant (11), congenital transmission (12), and laboratory accidents (13), allowing the disease to spread to urbanized areas (14).

Chagas disease occurs in two stages: the acute phase, which is without symptoms or with nonspecific manifestations in the majority of cases; and the chronic phase, characterized by cardiac and/or gastrointestinal disorders. In the chronic indeterminate phase of the disease, most patients remain asymptomatic all of their lives (15, 16).

Due to low and intermittent parasitemia, diagnosis during the chronic phase of Chagas disease is made by serological methods (10, 15, 16). There are two types of serological techniques for the detection of anti-*T. cruzi* antibodies: conventional tests using a whole-parasite antigen, and nonconventional tests based on recombinant antigens (17, 18). Cross-reactivity, especially in conventional assays, is a particular problem for the serological diagnosis of Chagas disease in regions where leishmaniasis also occurs (15, 19). Although numerous assays are available for diagnosing

Chagas disease, no single test is considered the reference standard (19–21).

To date, an individual is diagnosed as infected with *T. cruzi* in the chronic phase of the disease when the results of two serological tests are positive (17). When inconclusive or discordant results appear, a third technique (17) or additional samples are required (22), thereby increasing the cost of diagnosis. The plethora of serological tests used to identify *T. cruzi* infections often demonstrate discrepant results, which makes serum interpretation difficult (22, 23). Moreover, *T. cruzi* has great genetic diversity and is currently divided into six genotypes known as discrete typing units (DTUs) (TcI to TcVI) (24). Discordant results between assays are often attributed to antigenic differences among recombinant proteins or *T. cruzi* DTUs (23, 25).

New-generation tests with potentially improved accuracy have been developed recently. The use of a large mixture of recombinant antigens and the incorporation of different detection systems, such as chemiluminescence, increase the sensitivity and specificity of the techniques. Other advantages of new-generation

Received 22 January 2016 Returned for modification 9 February 2016
Accepted 18 March 2016

Accepted manuscript posted online 6 April 2016

Citation Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C, Martí C, Muñoz C. 2016. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change? *J Clin Microbiol* 54:1566–1572. doi:10.1128/JCM.00142-16.

Editor: P. H. Gilligan, UNC Health Care System

Address correspondence to Carmen Muñoz, cmunoz@santpau.cat.

A. Abras, M. Gállego, and C. Muñoz contributed equally to this article.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

tests are automation, rapidity, and high performance. Among them, the Architect Chagas (Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany), a chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), uses four recombinant proteins as the antigen (26–28).

The aim of the present study was to assess the overall accuracy of a new-generation kit that combines a mixture of recombinant proteins with chemiluminescence (Architect Chagas). The application of this single technique in the diagnosis of chronic Chagas disease modifies the aforementioned diagnostic recommendations. Accordingly, it might lead to a reduction in the cost and time of diagnosis and be the first step toward reaching a consensus on a standard protocol.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement. This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona, Spain (project code IIBSP-CHA-2013-33; CEIC no. 53/2013). All samples were anonymized before being evaluated and included in the study.

Study population and serum samples. A total of 315 serum samples from adults admitted to the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau of Barcelona (Spain) were used in this work. Clinical data were recorded by a retrospective review of patient files through the computer system Systems, Applications, and Products for Data Processing (SAP). Serum samples (conserved at -40°C) were collected during the period from January 2009 to December 2012 and divided into four panels (I to IV).

Panel I ($n = 107$) contained samples from chronic Chagas-seropositive patients from countries endemic for Chagas disease in Latin America who were diagnosed in Spain (96% from Bolivia, 2% from Argentina, and 2% from Paraguay).

Panel II ($n = 125$) contained samples from nonchagasic individuals from countries that were both endemic ($n = 64$) and nonendemic ($n = 61$) for Chagas disease.

For panels I and II, samples had concordant results for two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) using whole-parasite antigen (ELISAc) (29) and recombinant antigens (ELISAr) (BioELISA Chagas; Biokit, Lliçà d'Amunt, Spain). Clinical and epidemiological data were considered for the selection.

Panel III ($n = 12$) contained samples from individuals from countries endemic for Chagas disease with discrepant serological results diagnosed in Spain. These samples had discordant results for ELISAc and ELISAr and were also tested by Western blotting (WB) (19) in order to get the final interpretation (11 considered negative and 1 positive). Clinical and epidemiological data were also considered for the selection.

Panel IV ($n = 71$) contained samples from patients with other infectious diseases to evaluate cross-reactions (8 individuals with leishmaniasis, 7 with toxoplasmosis, 6 with amebic hepatic abscess, 3 with malaria, 6 with strongyloidiasis, 1 with visceral larva migrans [VLM], 3 with cytomegalovirus, 7 with human immunodeficiency virus [HIV], 4 with parvovirus B19, 5 with Epstein-Barr virus [EBV], 5 with hepatitis B virus [HBV], 2 with hepatitis C virus [HCV], 9 with syphilis, and 5 with Lyme borreliosis). All samples had serological and/or parasitological or molecular evidence of the presence of the infectious diseases studied.

Serological assays and interpretation of results. Since there is no single widely accepted reference standard test for the diagnosis of *T. cruzi* infections, 244 serum samples were precharacterized using two serological tests, according to WHO recommendations (17). The remaining 71 samples were taken from patients with other diagnoses (panel IV). For the serum precharacterization, the techniques used were two ELISAs, one of them in house and using sonicated epimastigotes of *T. cruzi* (ELISAc) (cutoff, ≥ 20 units) (29), and the second one with recombinant antigens (ELISAr) (results [sample ratio absorbance/cutoff value] of < 0.9 were considered negative, ≥ 1 was considered positive, and the gray zone was from ≥ 0.9 to < 1). Samples with positive results for both assays were

included in panel I, and sera with negative results were included in panel II. Samples with discordant results by these techniques were included in panel III, and they were tested by an in-house WB based on lysate *T. cruzi* epimastigotes, as described elsewhere (19). The final interpretation of panel III samples was based on results coinciding in two out of the three techniques performed; thus, 11 were considered negative and one was considered positive. In order to rule out Chagas disease, samples from patients with other infectious diseases (panel IV) were also analyzed through WB.

All sera were tested for the presence of *T. cruzi* antibodies by the CMIA Architect Chagas assay. This fully automated assay is based on recombinant proteins FP3, FP6, FP10, and TcF. In aggregate, these four hybrid recombinant proteins represent 14 distinct antigenic regions (30, 31). Testing was performed according to the manufacturer's instructions. The chemiluminescent reaction is measured in relative light units (RLUs). The results are expressed as sample RLUs/cutoff value (S/CO). Ratios of < 0.8 are considered negative, ratios of ≥ 1 are considered positive, and the gray zone was from ≥ 0.8 to < 1 .

Data analysis. The following measures of diagnostic accuracy were calculated (TP, true positive; TN, true negative; FP, false positive; FN, false negative): sensitivity (calculated as $\text{TP}/[\text{TP} + \text{FN}]$); specificity (calculated as $\text{TN}/[\text{TN} + \text{FP}]$); validity index, defined as the percentage of patients correctly classified (32) (calculated as $[\text{TP} + \text{TN}]/[\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}]$), positive and negative predictive values (PPV and NPV, respectively), which are the proportion of correctly diagnosed individuals with positive (PPV) or negative (NPV) results (33) (calculated as $\text{TP}/[\text{TP} + \text{FP}]$ and $\text{TN}/[\text{TN} + \text{FN}]$, respectively), positive and negative likelihood ratios (LR+, the highest value being the best result; and LR-, with the lowest value being the best result), which express how many times more or less frequently, respectively, the test result is obtained among individuals with the disease compared with those without the disease (34) (calculated as $\text{sensitivity}/[1 - \text{specificity}]$ and $[1 - \text{sensitivity}]/\text{specificity}$, respectively), the Youden index, which is a measure of the overall discriminative power of a diagnostic procedure (35) (calculated as $[\text{sensitivity} + \text{specificity}] - 1$), and Cohen's kappa coefficient, which describes the level of concordance among tests relating the observed agreement (Ao) and the agreement expected by chance (Ae) (36) (calculated as $[\text{Ao} - \text{Ae}]/[1 - \text{Ae}]$) (values, > 0.8 indicate a high level of agreement) (37). Calculations were performed with the software EPIDAT 3.1, which is available online at <http://www.sergas.es/Saude-publica>.

Economic evaluation. An economic assessment of the annual cost of Chagas disease serology at the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona was done. During the period from March 2014 to February 2015, a total of 718 serum samples were analyzed for the presence of *T. cruzi* antibodies in our hospital. Several calculations were done: (i) the annual cost of performing two assays (Architect Chagas and ELISAr) for all the 718 serum samples, according to the WHO recommendations; (ii) the annual cost of performing the Architect Chagas for all sera and confirming by the ELISAr gray zone (2 serum samples) and all positive samples (98 serum samples); and (iii) the annual cost of having to confirm by the second test only samples with gray-zone (2 serum samples) and positive results of ≤ 6 S/CO (19 serum samples), the strategy proposed in this study.

RESULTS

Sera were divided into four panels: panel I (samples from chronic chagasic patients), panel II (samples from nonchagasic patients), panel III (samples with discrepant serological results), and panel IV (samples from patients with other infectious diseases).

A coincident result of the Architect Chagas with the precharacterization was considered true positive (TP) or true negative (TN), and a discordant result with the precharacterization was considered false positive (FP) or false negative (FN) (Table 1). In this study, no FN results for Architect Chagas were observed.

Among the 244 serum samples precharacterized as positive or

TABLE 1 Overview of the results obtained with the Architect Chagas assay for the four panels of serum samples studied

Test result	No. with precharacterized sera				Total (n = 315)
	Panel I (n = 107)	Panel II (n = 125)	Panel III (n = 12)	No. in panel IV (n = 71)	
CMIA positive	107	1	1	5	114
CMIA negative	0	124	10	66	200
Gray zone	0	0	1	0	1
Total	107	125	12	71	315

TABLE 2 Measures of diagnostic accuracy of the Architect Chagas assay results

Measure ^a	Result (no./total no.)	95% CI ^b
Sensitivity (%)	100 (108/108)	99.54–100
Specificity (%)	97.56 (200/205)	95.21–99.92
Validity index (%)	98.40 (308/313)	96.85–99.95
PPV (%)	95.58 (108/113)	91.34–99.81
NPV (%)	100 (200/200)	99.75–100
LR+	41.00	17.25–97.45
LR–		
Youden index	0.98	0.95–1

^a PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR+, positive likelihood ratio; LR–, negative likelihood ratio.

^b 95% CI, 95% confidence interval.

negative for Chagas disease, 242 samples were concordant with the Architect Chagas results. Only one serum sample from panel II tested positive and was considered FP, and one serum sample from panel III gave a result in the gray zone. Therefore, the concordance level between precharacterized sera and the results obtained with the Architect Chagas was 99.2%.

The overall serum value distribution of ELISAc, ELISAr, and the Architect Chagas is shown in Fig. 1.

In reference to TP serum values (n = 108), 94 samples (87.04%) achieved results of >6 S/CO. The remaining 14 serum samples (12.96%) obtained values of ≤6 S/CO; 9 samples (8.33%) obtained S/CO values from 1 to 4.9, and 5 samples (4.63%) obtained S/CO values from 5 to 6.

When sera from patients with other infectious diseases were analyzed, 5 out of 71 samples were reactive by the Architect Chagas. All of them came from *Leishmania*-infected patients with Chagas disease ruled out by a WB method (19). These FP sera for the Architect Chagas also showed positive results for ELISAc (values between 53 and 84 units) and negative results for ELISAr, except in one case, in which the sample obtained a value in the gray zone.

The serum sample from panel III with a gray-zone result for the Architect Chagas was positive for ELISAc (FP), negative for ELISAr, and negative for WB. The serum sample from panel IV (*Leishmania* infection) with a gray-zone result for ELISAr was positive for both ELISAc and the Architect Chagas (FP) and negative for WB. These samples were not included in the calculations, resulting in a final panel of 313 serum samples.

The measures of diagnostic accuracy of the Architect Chagas assay are shown in Table 2. Sensitivity, calculated using panels I and III, was 100%. Specificity, calculated using panels II, III and IV, was 97.6%. FP sera obtained S/CO results between 1.8 and 4.6, and 5 out of 6 samples came from *Leishmania*-infected patients (Table 3). A high proportion of patients were correctly classified (validity index, 98.4%), and the test showed a high level of agreement with the two techniques used in the precharacterization; a kappa index of 0.91 (95% confidence interval [CI], 0.86 to 0.95) with ELISAc and a value of 0.94 (95% CI, 0.90 to 0.98) with ELISAr.

ELISAc scored 17 FP results, with 8 in panel III and 9 in panel IV (7 serum samples with *Leishmania* infection and 2 with EBV). Therefore, the test showed 100% sensitivity (95% CI, 99.5 to 100%), 91.7% specificity (95% CI, 87.7 to 95.7%), and the validity index was 94.6% (95% CI, 91.9 to 97.2%). ELISAr achieved 3 FP results and 1 FN result, with 2 FP results and the FN result in panel III, and 1 FP result in panel IV (serum with EBV). Consequently, the sensitivity and specificity of the technique were 99.1% (95% CI, 96.8 to 100%) and 98.5% (95% CI, 96.7 to 100%), respectively, and the validity index was 98.7% (95% CI, 97.3 to 100%).

The annual cost of performing two assays for Chagas disease diagnosis in our hospital in Barcelona is €6,864.08 or \$7,413.21. From the 718 samples analyzed from March 2014 to February 2015, 618 (86.1%) samples tested negative using the Architect

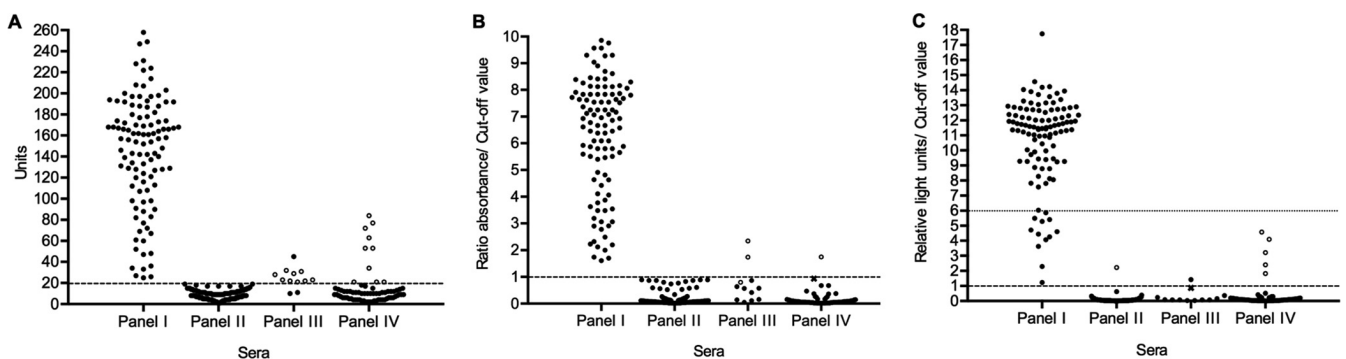


FIG 1 Overall serum value distribution of ELISAc (A), ELISAr (B), and Architect Chagas (C). Serum samples from panel I (samples from chronic chagasic seropositive patients, n = 107), panel II (samples from nonchagasic patients, n = 125), panel III (samples with discrepant serological results, n = 12), and panel IV (samples from patients with other infections, n = 71) are represented. Filled circles (●) indicate true-positive and negative results, open circles (○) indicate false-positive and negative results, and Xs (×) represent results in the gray zone. Dashed lines represent the cutoff value established for each test: 20 units for ELISAc (A), 1 absorbance/cutoff value for ELISAr (B), and 1 relative light unit/cutoff value for Architect Chagas (C). The dotted line in panel C indicates the point of the 6 relative light units/cutoff value on the y axis.

TABLE 3 FP serum results of the Architect Chagas assay ($n = 6$)

FP serum sample	Architect Chagas (S/CO) ^a	Other infection(s)
1	2.22	Unknown
2	1.83	Leishmaniasis
3	4.57	Leishmaniasis
4	4.09	Leishmaniasis
5	3.21	Leishmaniasis
6	2.40	Leishmaniasis

^a S/CO, sample relative light units/cutoff value.

Chagas. Taking into account the 100% sensitivity of the test found in this study, it was possible to classify the sera as negative using only a single technique. The remaining 100 serum samples (13.9%) were analyzed by two tests (Architect Chagas and ELISAr), since the Architect Chagas gave gray-zone (2 serum samples [0.3%]) or positive results (98 serum samples; [13.6%]). Positive samples with results of >6 S/CO (79 serum samples [11%]) were also analyzed with a second test (ELISAr), confirming that all of them were TP. This represents an annual cost of €3,156.08 or \$3,408.57. We propose that gray-zone (2 serum samples [0.3%]) and samples with positive results of ≤ 6 S/CO (19 serum samples [2.6%]) require further confirmation (TP, 57.9%). If inconclusive results appear, a third technique or additional samples are required. Confirmation by a second test was necessary in only 21 serum samples instead of the 100 positive and inconclusive samples. As a result, the annual cost by not having to confirm all positive samples would be €2,682.08 or \$2,896.65 in the hospital population, which represents savings of €4,182 or \$4,516.56 per year.

DISCUSSION

Despite the absence of the vector, Chagas disease is now an emerging public health problem in Europe and the United States due to immigration from areas endemic for the disease (3, 4). Chronic forms of the disease have appeared in countries that are nonendemic (4, 38, 39), as well as acute forms, principally due to vertical transmission (40–42). In Europe, chronic forms are more abundant than congenital cases.

Chronic forms of Chagas disease are diagnosed serologically, requiring two tests for confirmation (17). According to the World Health Organization (17), an ideal serological test should be easy to perform in a single step, be fast, cheap, require no special equipment or refrigeration of reagents, and have 100% sensitivity and specificity; unfortunately, no such test exists for Chagas disease. The lack of a reference standard serological assay for the diagnosis of *T. cruzi* infection has prompted the development of new tests, which require further evaluation. Among them, the Architect Chagas, a fully automated assay using four recombinant proteins as the antigen, has been scarcely studied to date (26–28).

Serum precharacterization was performed by ELISAc, a conventional method using parasite lysate as the antigen (29), and ELISAr, based on *T. cruzi* TcF antigen, a recombinant fusion protein that comprises four serologically active peptides (PEP-II, TcD, TcE, and TcLo1.2) (43, 44). The assay evaluated here, the Architect Chagas, incorporates three recombinant proteins (FP3, FP6, and FP10) in addition to the TcF of ELISAr (30, 31, 45, 46). These four proteins in aggregate represent 14 different antigenic regions present throughout the life cycle of *T. cruzi* (30, 45). Moreover, *T. cruzi* is currently divided into six DTUs with distinct ge-

netic profiles (24). The Architect Chagas is capable of detecting the genetic diversity of *T. cruzi* by the incorporation of highly conserved antigenic proteins with tandemly repeated amino acid domains (26, 45).

A well-known problem in the serological diagnosis of Chagas disease is cross-reaction with antibodies produced by other pathogens, especially *Leishmania* species (15, 19, 47). All FP sera for the Architect Chagas except one (5 out of 6) came from patients with leishmaniasis (panel IV) (see Table 3). Although all patients were from Spain, these samples were analyzed by WB using *T. cruzi* lysate epimastigotes as an antigen (19) in order to check for possible *Leishmania-T. cruzi* coinfections. Chagas disease was ruled out in all five cases because of negative results. The remaining FP serum sample belonged to a precharacterized negative patient (panel II) from an area endemic for the disease, in which leishmaniasis was ruled out. No data of other possible pathologies of the patient were known.

In this report, the Architect Chagas recombinant test showed 100% sensitivity, while its specificity was 97.6% due to cross-reactions in the leishmaniasis patients. The specificity achieved by the Architect Chagas assay excluding cross-reactions with *Leishmania* spp. would be 99.5%. The Architect Chagas results were highly concordant with tests using crude antigens, such as ELISAc (kappa index, 0.91), but with higher specificity (ELISAc sensitivity, 100%; specificity, 91.7%). While the Architect Chagas gave positive results in 5 out of 8 serum samples from *Leishmania*-infected patients, indicating cross-reactions, ELISAc scored positive results in all 8 serum samples with *Leishmania* species. The technique evaluated here also showed a high level of agreement with the ELISAr results (kappa index, 0.94). Although the specificity shown by ELISAr and even the validity index were higher than those with the Architect Chagas, this technique did not detect all positive sera (ELISAr sensitivity, 99.1%; specificity, 98.5%; validity index, 98.7%). Indeed, the Architect Chagas is better able than the ELISAc and ELISAr to discriminate between positive and negative sera (see Fig. 1). The higher sensitivity of the Architect Chagas is probably due to the greater diversity of proteins used as antigens, representing the three morphological forms (trypomastigotes, epimastigotes, and amastigotes) and the genetic diversity of *T. cruzi* (26, 45). Among current tests in which the number of recombinant proteins is known, the Architect Chagas uses the most. This higher number of recombinant antigens might also explain the high level of cross-reactions with *Leishmania* species infection. Consequently, this fact should be considered when studying the diagnosis of Chagas disease in areas endemic for visceral leishmaniasis. Other authors previously reported that mixtures of recombinant proteins are very useful as antigens for the immunodiagnosis of Chagas disease (48, 49).

New-generation techniques, such as the Architect Chagas or Bio-Flash Chagas (Biokit, Lliçà d'Amunt, Spain) (50), have improved the diagnosis of Chagas disease with innovative new tools (large mixture of recombinant antigens and chemiluminescence as detection system). Previous studies have also proposed a chemiluminescent ELISA (CL-ELISA) with purified trypomastigote glycoproteins for the detection of lytic protective antibodies against *T. cruzi* in human serum (33, 51, 52). CL-ELISA achieved high diagnostic accuracy in both areas that are endemic (51, 52) and nonendemic (33) for the disease. Detection systems, such as chemiluminescence, increase light amplification and signal duration in comparison with traditional ELISAs.

Both characteristics, the larger number of recombinant antigens and signal amplification, lead to higher accuracy in the diagnosis of Chagas disease compared to that with the conventional and recombinant techniques used in this study.

Other authors have evaluated the Architect Chagas using different populations or sample conditions (26–28). Their overall results (26–28) suggest that the Architect Chagas is a highly suitable assay for the diagnosis of chronic *T. cruzi* infection, and its use as a single technique for routine testing in high-prevalence areas has already been recommended (26). In contrast to what is proposed here, a reduction from 1 to 0.88 in the CO value has been recommended, but only when blood samples on filter paper are used (28).

According to the results in the present study, and preserving the manufacturer's criteria for the interpretation of results, we propose the Architect Chagas or other similar new-generation tests, as a single technique for the diagnosis of chronic Chagas disease in blood banks and clinical laboratories in both areas that are endemic and nonendemic for the disease. Taking into account the positive and cross-reactivity results obtained and the overall distribution of serum values (see Fig. 1C), we suggest that only gray-zone and positive sera with results of ≤ 6 S/CO would need to be confirmed by a second serological assay, in agreement with WHO recommendations. Sera with these results represented < 18% of the positive samples and 6.3% of the total sera analyzed in this study. Further studies with other new-generation techniques with similar characteristics (recombinant antigens and chemiluminescence) are necessary.

Several control measures exist for Chagas disease, according to the different transmission scenarios (7, 14, 53), some of which have been applied by health organizations or administrative governments (54–58). Previous studies on the cost-effectiveness of Chagas disease management have been undertaken (59–62), but the costs of different diagnostic methods have not been compared.

The adoption of a single high-performance technique, like the one studied here, would entail a significant savings. Indeed, the savings would be €4,182 or \$4,516.56 per year in our hospital, if the comparison is with the cost of performing two assays for all sera, the strategy recommended by the WHO that is used to date. Our proposal would allow the optimization of screening procedures and cost according to the document of the 63rd World Health Assembly (63).

According to Sicuri et al. (59), 1.7 million migrants from Latin American countries endemic for Chagas disease live in Spain, where 42,173 adult immigrants are estimated to be infected with *T. cruzi* (64). By 2009, an estimated 68,000 to 122,000 Latin American immigrants in Europe were thought to be infected by *T. cruzi*, but only 4,290 of them were diagnosed (65). Although Chagas disease has become a real problem for countries hosting Latin American migrants, not all European countries screen for the infection (57, 66), a problem that may have been exacerbated by the recent economic crisis (57). Therefore, the management of Chagas disease in countries nonendemic for the disease is crucial to controlling the infection. For an individual with chronic Chagas disease, the estimated average lifetime cost of health care is \$27,684, with considerable variations between countries (60). Other authors have reported that in the long term, it is cheaper to diagnose and treat individuals with Chagas disease than not (61). Accordingly, the high rate of underdiagnosis in countries that are nonendemic might contribute to increases in the final cost of Cha-

gas disease patients. The use of a single technique would reduce diagnosis costs and therefore allow the application of screening and control programs in countries where such systems have not yet been implemented.

In conclusion, the Architect Chagas is a highly effective assay for the diagnosis of Chagas disease, with 100% sensitivity, and it allows the correct diagnosis of the majority of samples when applied as a single technique. The Architect Chagas can be used as a single assay in blood banks and clinical laboratories for routine diagnosis. Only gray-zone and positive serum samples with a result of ≤ 6 S/CO would need to be confirmed by a second serological assay to avoid both FP sera and cross-reactions with *Leishmania* species. The application of this proposal would result in important savings in the cost of Chagas disease diagnosis and therefore in the management and control of the disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Montserrat Portús, Joaquim Gascón, and Pere Coll for their support and helpful scientific discussions.

We declare no conflicts of interest.

This work was partially supported by Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya, Spain (grant 2014SGR026). A.A., M.G., and S.T. belong to RICET, a Tropical Disease Cooperative Research Network in Spain (grant RD12/0018/0010). C.M. belongs to the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (grant REIPRD12/0015), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

FUNDING INFORMATION

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

REFERENCES

- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA. 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- World Health Organization. 2015. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 90:33–44.
- Schmunis GA. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102(Suppl 1):75–85.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 115:22–27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>.
- Roca C, Pinazo MJ, López-Chejade P, Bayó J, Posada E, López-Solana J, Gállego M, Portús M, Gascón J, Chagas-Clot Research Group. 2011. Chagas disease among the Latin American adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1135. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001135>.
- Prata A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 1:92–100. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2).
- Sosa-Estani S, Segura EL. 2015. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:289–298. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140408>.
- Benchimol-Barbosa PR. 2010. Trends on acute Chagas' disease transmitted by oral route in Brazil: steady increase in new cases and a concealed residual fluctuation. *Int J Cardiol* 145:494–496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.08.030>.
- Alarcón de Noya B, Noya González O. 2015. An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop* 151:94–102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.004>.
- Angehen A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, Gandini G, Aprili G. 2015. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 13:540–550.
- Kransdorf EP, Zakowski PC, Kobashigawa JA. 2014. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 27:418–424. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0000000000000088>.

12. Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P. 2015. Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:363–368. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760140405>.
13. Herwaldt BL. 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 14:659–688. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.14.3.659-688.2001>.
14. Pinazo MJ, Gascon J. 2015. The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop* 151:16–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.013>.
15. Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 25(Suppl 3):29–37.
16. Bern C. 2015. Chagas' disease. *N Engl J Med* 373:456–466. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMr1410150>.
17. World Health Organization. 2002. Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 905:1–109.
18. Longhi SA, Brandariz SB, Lafon SO, Niborski LL, Luquetti AO, Schijman AG, Levin MJ, Gómez KA. 2012. Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. *Am J Trop Med Hyg* 87:267–271. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0533>.
19. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M. 2012. Short report: identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg* 86:412–416. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0111>.
20. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, Cañavate C. 2010. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:284–293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2009.07.005>.
21. Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar-Viñas P. 2011. Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1250. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250>.
22. Lapa JS, Saraiva RM, Hasslocher-Moreno AM, Georg I, Souza AS, Xavier SS, do Brasil PE. 2012. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:965–974. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1393-9>.
23. Guzmán-Gómez D, López-Monteón A, de la Soledad Lagunes-Castro MS, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A. 2015. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors* 8:466. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>.
24. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* sub-specific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12:240–253. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.
25. Reis-Cunha JL, Mendes TA, de Almeida Lourdes R, Ribeiro DR, Machado-de-Avila RA, de Oliveira Tavares M, Lemos DS, Câmara AC, Olórtégui CC, de Lana M, da Cunha Galvão LM, Fujiwara RT, Bartholomeu DC. 2014. Genome-wide screening and identification of new *Trypanosoma cruzi* antigens with potential application for chronic Chagas disease diagnosis. *PLoS One* 9:e106304. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0106304>.
26. Praast G, Herzogenrath J, Bernhardt S, Christ H, Sickinger E. 2011. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 69:74–81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.019>.
27. Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-Hernández M. 2012. ARCHITECT Chagas: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30:463–465. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2012.02.002>.
28. Holguín A, Norman F, Martín L, Mateos ML, Chacón J, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. 2013. Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol* 20:1197–1202. <http://dx.doi.org/10.1128/0142-861X.00221-13>.
29. Riera C, Vergés M, López-Chejade P, Piron M, Gascón J, Gállego M, Portús M. 2009. Desarrollo y evaluación de una técnica ELISA con antígeno crudo de *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enferm Emerg* 11:22–29.
30. Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW, Bryant JD, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO. 2006. Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. *Transfusion* 46:1737–1744. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00965.x>.
31. Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO. 2007. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine Immunol* 14:355–361. <http://dx.doi.org/10.1128/0142-861X.00401-06>.
32. TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel, Banoo S, Bell D, Bossuyt P, Herring A, Mabey D, Poole F, Smith PG, Sriram N, Wongsrichanalai C, Linke R, O'Brien R, Perkins M, Cunningham J, Matsoso P, Nathanson CM, Olliaro P, Peeling RW, Ramsay A. 2010. Evaluation of diagnostic tests for infectious diseases: general principles. *Nat Rev Microbiol* 8(Suppl 12):S17–S29.
33. Izquierdo L, Marques AF, Gállego M, Sanz S, Tebar S, Riera C, Quintó L, Aldasoro E, Almeida IC, Gascon J. 2013. Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:928–931. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130112>.
34. Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, Francino O, López-Fuertes L, Timón M, Alberola J. 2010. *Leishmania* infection: laboratory diagnosing in the absence of a "gold standard." *Am J Trop Med Hyg* 82:251–256. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0366>.
35. Youden WJ. 1950. Index for rating diagnostic tests. *Cancer* 3:32–35. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(1950\)3:1<32::AID-CNCR2820030106>3.0.CO;2-3](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(1950)3:1<32::AID-CNCR2820030106>3.0.CO;2-3).
36. Cohen J. 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas* 20:37–46. <http://dx.doi.org/10.1177/001316446002000104>.
37. Landis JR, Koch GG. 1977. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33:159–174. <http://dx.doi.org/10.2307/2529310>.
38. Bern C, Montgomery SP. 2009. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 49:e52–e54. <http://dx.doi.org/10.1086/605091>.
39. Herrador Z, Rivas E, Gherasim A, Gomez-Barroso D, García J, Benito A, Aparicio P. 2015. Using hospital discharge database to characterize Chagas disease evolution in Spain: there is a need for a systematic approach towards disease detection and control. *PLoS Negl Trop Dis* 9:e0003710. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003710>.
40. Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M, Gascon J. 2009. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 111:51–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.005>.
41. Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, del Pino M, Fumado V, Bosch J, Posada EJ, Hernandez S, Fisa R, Bogaña JM, Gállego M, Sanz S, Portús M, Gascón J. 2009. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis* 48:1736–1740. <http://dx.doi.org/10.1086/599223>.
42. Riera C, Guarro A, El Kassab H, Jorba JM, Castro M, Angrill R, Gállego M, Fisa R, Martín C, Lobato A, Portús M. 2006. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg* 75:1078–1081.
43. Ferreira AW, Belem ZR, Lemos EA, Reed SG, Campos-Neto A. 2001. Enzyme-linked immunosorbent assay for serological diagnosis of Chagas' disease employing a *Trypanosoma cruzi* recombinant antigen that consists of four different peptides. *J Clin Microbiol* 39:4390–4395. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.12.4390-4395.2001>.
44. Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill PD, Sleath PR, Lodes MJ, Skeiky YAW, Leiby DA, Badaro R, Reed SG. 1999. A multi-epitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in radioimmunoprecipitation-confirmed and consensus-positive sera. *J Infect Dis* 179:1226–1234. <http://dx.doi.org/10.1086/314723>.
45. da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. 2001. Chagas disease: recom-

- binant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17:286–291. [http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01897-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01897-9).
46. Frasc ACC, Cazzulo JJ, Åslund L, Pettersson U. 1991. Comparison of genes encoding *Trypanosoma cruzi* antigens. *Parasitol Today* 7:148–151. [http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90284-U](http://dx.doi.org/10.1016/0169-4758(91)90284-U).
 47. Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, Medina M, Ward BJ. 2006. Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 44:291–296. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.2.291-296.2006>.
 48. Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF. 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 43:91–97. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.2003.00279.x>.
 49. Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, Revollo S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, da Silveira JF. 2004. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol* 42:449–452. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.1.449-452.2004>.
 50. Faraudo S, López N, Canela B, Guimarães A, Sáez-Alquezar A. 2015. Evaluation in Brazil of the new Bio-Flash Chagas assay on Biokit's Bio-Flash analyzer. *Rep Esp Salud Pública* 2015:65–66.
 51. Almeida IC, Covas DT, Soussumi LM, Travassos LR. 1997. A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 37:850–857. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1537-2995.1997.37897424410.x>.
 52. De Marchi CR, Di Noia JM, Frasc ACC, Amato Neto V, Almeida IC, Buscaglia CA. 2011. Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas' disease. *Clin Vaccine Immunol* 18:1850–1855. <http://dx.doi.org/10.1128/CVI.05289-11>.
 53. Nouvellet P, Cucunubá ZM, Gourbière S. 2015. Ecology, evolution and control of Chagas disease: a century of neglected modelling and a promising future. *Adv Parasitol* 87:135–191. <http://dx.doi.org/10.1016/bs.apar.2014.12.004>.
 54. Generalitat de Catalunya. 2010. Protocolo de cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain. http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/chagas/documents/arxiu/chagas_espanyol.pdf.
 55. Basile L, Oliveira I, Ciruela P, Plasencia A, Working Group For Developing The Catalonian Screening Programme For Congenital Transmission Of Chagas Disease. 2011. The current screening programme for congenital transmission of Chagas disease in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* 16:pil=19972. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19972>.
 56. Albajar-Viñas P, Jannin J. 2011. The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill* 16:pil=19975. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19975>.
 57. Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J, Chagas Disease COHEMI Working Group. 2014. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3245. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003245>.
 58. Bonney KM. 2014. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21:11. <http://dx.doi.org/10.1051/parasite/2014012>.
 59. Sicuri E, Muñoz J, Pinazo MJ, Posada E, Sanchez J, Alonso PL, Gascon J. 2011. Economic evaluation of Chagas disease screening of pregnant Latin American women and of their infants in a non endemic area. *Acta Trop* 118:110–117. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.012>.
 60. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis* 13:342–348. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1).
 61. Ramsey JM, Elizondo-Cano M, Sanchez-González G, Peña-Nieves A, Figueroa-Lara A. 2014. Opportunity cost for early treatment of Chagas disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2776. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002776>.
 62. Imaz-Iglesia I, Miguel LG-S, Ayala-Morillas LE, García-Pérez L, González-Enríquez J, Blasco-Hernández T, Martín-Águeda MB, Sarria-Santamera A. 2015. Economic evaluation of Chagas disease screening in Spain. *Acta Trop* 148:77–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.014>.
 63. 63rd World Health Assembly. 2010. WHA63.20. Chagas disease: control and elimination. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://www.who.int/neglected_diseases/mediacentre/WHA_63.20_Eng.pdf.
 64. Navarro M, Navaza B, Guionnet A, López-Vélez R. 2012. Chagas disease in Spain: need for further public health measures. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1962. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001962>.
 65. Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, Seixas J, Van Gool T, Canavate C, Flores-Chavez M, Jackson Y, Chiodini PL, Albajar-Viñas P, Working Group on Chagas Disease. 2011. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill* 16:pil=19968. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19968>.
 66. Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. 2015. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 15:1347–1356. [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00243-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00243-1).

CAPÍTULO 2

Towards a new strategy for the diagnosis of
congenital *Trypanosoma cruzi* infection

HACIA UNA NUEVA ESTRATEGIA PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA
INFECCIÓN CONGÉNITA POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

Alba Abras, Carmen Muñoz, Cristina Ballart, Pere Berenguer, Teresa Llovet, Mercedes Herrero, Silvia Tebar, María-Jesús Pinazo, Elizabeth Posada, Carmen Martí Victoria Fumadó, Jordi Bosch, Oriol Coll, Teresa Juncosa, Gemma Ginovart, Josep Armengol, Joaquim Gascón, Montserrat Portús, Montserrat Gállego

JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, aceptado

Factor de impacto: 3,631

RESUMEN

La migración de mujeres latinoamericanas en edad fértil ha expandido la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas a zonas no endémicas y, actualmente, la enfermedad es un problema global. Algunas autoridades sanitarias europeas han implementado programas de cribado para prevenir la transmisión vertical pero la falta de un protocolo consensuado requiere el establecimiento urgente de una nueva estrategia, común para todos los laboratorios. Los objetivos fueron (i) analizar la tendencia de los anticuerpos IgG pasivos en el recién nacido mediante cinco tests serológicos para el diagnóstico y seguimiento de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi*, (ii) evaluar la utilidad de estas técnicas en el diagnóstico de la infección congénita, y (iii) proponer una estrategia rápida, eficiente y costo-efectiva para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. En los recién nacidos no infectados, ningún test serológico serorevertió en todos los casos antes de los 12 meses. A partir de los 12 meses, los tests serológicos obtuvieron resultados negativos en todas las muestras analizadas, excepto el inmuno-ensayo de micropartículas quimioluminiscentes (CMIA) por su elevada sensibilidad. Por el contrario, en los niños con infección la disminución de anticuerpos se detectó después del inicio del tratamiento. Para mejorar el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi*, proponemos una nueva estrategia que requiere un menor número de técnicas y permite un ahorro significativo. El protocolo podría empezar un mes después del nacimiento con un test parasitológico y/o una PCR. Si el

resultado es negativo, se podría realizar un test serológico a los nueve meses. Si este es positivo, se realizaría otro test serológico de confirmación aproximadamente a los 12 meses de edad.

1 Towards a new strategy for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection

2

3 Alba Abras,^{a,b,c,*} Carmen Muñoz,^{d,e,f,#,*} Cristina Ballart,^{a,b} Pere Berenguer,^d Teresa4 Llovet,^d Mercedes Herrero,^d Silvia Tebar,^{a,b} María-Jesús Pinazo,^b Elizabeth Posada,^b5 Carmen Martí,^g Victoria Fumadó,^h Jordi Bosch,^{b,i} Oriol Coll,^j Teresa Juncosa,^k Gemma6 Ginovart,^l Josep Armengol,^m Joaquim Gascón,^b Montserrat Portús,^{a,*} Montserrat7 Gállego,^{a,b,*}

8

9 Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de

10 Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain^a; ISGlobal, Barcelona Centre for11 International Health Research (CRESIB), Barcelona, Spain^b; Laboratori d'Ictiologia12 Genètica, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Girona, Spain^c; Servei de13 Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain^d; Institut

14 d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau,

15 Barcelona, Spain^e; Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de16 Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain^f; Unitat de Microbiologia, Hospital General de17 Granollers, Granollers, Spain^g; Servei de Pediatria, Unitat de Medicina Importada,18 Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain^h; Servei de19 Microbiologia, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spainⁱ;

20 Departament de Medicina Materno-Fetal, Institut Clínic de Ginecologia, Obstetrícia i

21 Neonatologia, Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain^j; Servei de22 Microbiologia, Hospital Universitari Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Spain^k;23 Unitat de Neonatologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain^l; Servei24 de Ginecologia i Obstetrícia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain^m

25

26 #Address correspondence to Carmen Muñoz: Servei de Microbiologia, Hospital de la
27 Santa Creu i Sant Pau, Sant Quintí 89, 08026, Barcelona, Spain. Tel.: +34 935537298.
28 FAX: +34 935537287. E-mail address: cmunoz@santpau.cat

29

30 *These authors have contributed equally to the study

31

32 **Running title:** New strategy for congenital Chagas diagnosis

33

34 **Keywords:** congenital Chagas disease, serology, flowchart, non-endemic countries,
35 immigrant population, Spain, Europe

36 **ABSTRACT**

37 The immigration of Latin American women of childbearing age has spread the
38 congenital transmission of Chagas disease to non-endemic areas, and the disease is now
39 a worldwide problem. Some European health authorities have implemented screening
40 programs to prevent vertical transmission, but the lack of a uniform protocol calls for
41 the urgent establishment of a new strategy, common for all laboratories. Our aims were
42 (i) to analyze the trend of passive IgG antibodies in the newborn by means of five
43 serological tests for the diagnosis and follow-up of congenital *Trypanosoma cruzi*
44 infection, (ii) to assess the utility of these techniques for diagnosing a congenital
45 transmission, and (iii) to propose a strategy for a prompt, efficient and cost-effective
46 diagnosis of *T. cruzi* infection. In non-infected newborns, a continuous decreasing trend
47 of passive IgG antibodies was observed, but none of the serological assays seroreverted
48 in all the infants before 12 months. From 12 months onwards, serological tests achieved
49 negative results in all the samples analyzed, with the exception of the highly sensitive
50 chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA). In contrast, in congenitally
51 infected infants, the antibody decline was only detected after treatment initiation. In
52 order to improve the diagnosis of congenital *T. cruzi* infection, we propose a new
53 strategy involving fewer tests that allows significant cost savings. The protocol could
54 start 1 month after birth with a parasitological test and/or a PCR. If negative, a
55 serological test would be carried out at 9 months, which if positive, would be followed
56 by another at around 12 months for confirmation.

57

58 **INTRODUCTION**

59 Chagas disease or American Trypanosomiasis is a zoonotic and parasitic
60 infection caused by *Trypanosoma cruzi*, affecting around six million people in Latin
61 America (1), where it is estimated that approximately two million women of
62 childbearing age are infected (2, 3). In endemic areas, the infection is mainly due to
63 vectorial transmission, while in areas where the vector is absent, *T. cruzi* can be
64 transmitted by alternative routes such as blood transfusion, organ transplant and vertical
65 transmission (4). In non-endemic areas strict protocols exist in blood banks and
66 transplants so mother-to-child transmission is the main route for *T. cruzi* transmission
67 and its control represents an important challenge (5–7).

68 The immigration of Latin American women of childbearing age has spread the
69 congenital transmission of Chagas disease to non-endemic areas (2), especially Europe
70 and the United States (8–10), and the disease has become a worldwide health problem.
71 A total of approximately 1.7 million people from countries endemic for Chagas disease
72 live in Spain, and around 50% of them are women of reproductive age (11).

73 In areas where *T. cruzi* is endemic, its prevalence in pregnant women is highly
74 variable (from 5 to 40%), depending on their geographical origin, and the congenital
75 transmission rate from mother to child is about 1-12% (12–16). Cases of congenital *T.*
76 *cruzi* infection have also been described in Spain (17–22). The rates of seroprevalence
77 and transmission in pregnant Latin American women living in Spain reported by Muñoz
78 et al. 2009 (21) are 3.4% and 7.3%, respectively. Nevertheless, a point to consider is the
79 high index of underdiagnosis (23).

80 Congenital infection with *T. cruzi* is mostly asymptomatic and may progress to
81 chronic Chagas disease with cardiac and/or gastrointestinal disorders years later (24–
82 26). In cases of symptomatic Chagas disease, there is a spectrum of clinical

83 manifestations, commonly non-specific, and they can appear at birth or days later (24,
84 27). Severe cases have a mortality rate of approximately 5% and are associated with
85 myocarditis and meningoencephalitis (7, 24).

86 Benznidazole and Nifurtimox are the only approved trypanocidal drugs with
87 proven efficacy for the treatment of Chagas disease (28). Both compounds are better
88 tolerated in infancy and more effective during the acute phase of the infection (28–30).
89 Treatment within the first year of life is close to 100% effective and without the adverse
90 reactions seen in adults (29, 31, 32). Treating infected women of childbearing age could
91 be a useful strategy to prevent the congenital transmission of *T. cruzi* (16, 33). In Spain,
92 a study also reported that the screening of pregnant Latin American women and their
93 infants to detect and treat congenital cases at an early stage is cost-effective (11).

94 During the first weeks of life, the diagnosis relies on the microscopic
95 observation of bloodstream parasites, usually with concentration techniques like the
96 microhaematocrit method or micromethod (14). The micromethod has been used for
97 many years in endemic areas for the early detection of parasites in newborn blood,
98 although its lack of sensitivity can miss up to 50% of infected infants (34). The
99 sensitivity of the technique varies according to the parasitemia (35). Parasite detection
100 in blood by molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) may
101 improve early diagnosis (27, 31, 36, 37). The parasite burden is at its maximum one
102 month after birth (25, 38, 39), so it would be preferable to perform the PCR at this time
103 and also to avoid false positive diagnosis in case of parasite DNA transmission from
104 mother to fetus (25). Amniotic fluid is not useful for the diagnosis of congenital *T. cruzi*
105 infection (40) and there is disagreement about the utility of umbilical cord blood (41).

106 Serological tests are useful for chronic diagnosis and also for the follow-up of
107 newborns if the direct diagnosis has not been conclusive (31). However, to date, no

108 single serological test is considered the reference standard for the diagnosis of Chagas
109 disease (42). Consequently, the confirmation of the infection requires coincident
110 positive results of two tests in infants aged >8 months in order to avoid the detection of
111 anti-*T. cruzi* IgG antibodies of maternal origin (31, 42). A third technique should be
112 performed when the results are conflicting (42). The detection of anti-*T. cruzi* IgM
113 antibodies in the newborn is controversial (36, 41). Rodríguez et al. (2005) (43)
114 reported that IgM antibodies were not useful for the diagnosis because they could
115 appear in response to the excretion/secretion of *T. cruzi* antigens, which cross the
116 placenta.

117 In order to prevent vertical transmission, some European health authorities have
118 implemented screening programs for pregnant Latin American women and their babies
119 (44–51). Early diagnosis and treatment of the newborns have high priority in the control
120 programs (14). However, the existence of procedural differences between protocols
121 urgently calls for the establishment of a new and more efficient strategy, common for all
122 laboratories.

123 The aims of this study were (i) to analyze the trend of passive IgG antibodies in
124 the newborn by means of five serological tests for the diagnosis and follow-up of
125 congenital *T. cruzi* infection, (ii) to assess the utility of these techniques in the diagnosis
126 of a congenital transmission, and (iii) to propose a suitable strategy for a prompt,
127 efficient and cost-effective diagnosis of *T. cruzi* infection.

128

129 MATERIAL AND METHODS

130 ***Ethics approval.*** This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee
131 (CEIC) of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona (Project code: IIBSP-
132 CHA-2013-33; CEIC number: 53/2013). All samples were anonymized before being

133 evaluated and included in the study.

134 **Study population and samples.** Peripheral blood samples and sera from 81 newborns of
135 Latin American Chagas-infected mothers admitted to three hospitals of Barcelona
136 (Spain) were analyzed. Samples were collected during the period from April 2003 to
137 December 2015 and stored at -40°C. The mothers of the newborns were identified by
138 two serological assays, according to the World Health Organization (WHO)
139 recommendations (42).

140 **DNA extraction and Real-Time PCR.** DNA was extracted from 200 µL of EDTA-
141 blood with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany)
142 and eluted in 200 µL of elution buffer (EB) according to the manufacturer's
143 instructions. Five µL of the extracted DNA was amplified in triplicate by a Real-Time
144 PCR (RT-PCR) targeted at the *T. cruzi* satellite DNA (SatDNA) as described by Pirón
145 et al. (2007) (52). The amplification was carried out in an ABI7900 device (Applied
146 Biosystems) and the RNase P human gene (Life Technologies, Austin, Texas) was
147 included as an internal control of the RT-PCR amplification. A sample was considered
148 valid when the RNase P human gene was efficiently amplified and was considered
149 positive when the cycle threshold (Ct) was ≤ 40 in at least one of the three replicates.

150 **Serological assays.** Sera were tested by five serological assays: an indirect fluorescent
151 antibody test (IFAT), two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), a
152 chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA), and a Western blot (WB).
153 IFAT. The test (Trypanosomiasis IFA test system, Trinity Biotech, Bray Country,
154 Wicklow, Ireland) was performed according to the manufacturer's instructions with
155 some modifications. Epimastigotes of *T. cruzi* (Corpus Cristi strain) were used as the
156 antigen. Double dilutions of sera from 1:20 to 1:5120 were used and $\geq 1:40$ was
157 established as the cutoff.

158 *In house* ELISA (ELISAc). Testing was performed as previously described by Riera et
 159 al. (2009) (53). Sonicated epimastigotes of *T. cruzi* (Maracay strain) were used as the
 160 antigen. Sera were diluted 1:200 in PBS-Tween 20 (0.05%)-skimmed milk (1%). The
 161 reaction was quantified as units (U) that relate the OD₄₉₂ obtained from the problem sera
 162 with that of the mean of three replicates of a calibrator serum arbitrarily set at 100 U.
 163 The cutoff was established at 20 U.

164 BioELISA (ELISAr). Testing was performed according to the manufacturer's
 165 instructions (BioELISA Chagas, Biokit, Lliçà d'Amunt, Spain). This test contains the
 166 recombinant antigen TcF, which is a *T. cruzi* fusion protein. The TcF antigen consists of
 167 a linear assembly of four serologically active peptides, PEP-II, TcD, TcE, and TcLo1.2.
 168 Sera were diluted 1:20 in the sample diluent supplied with the commercial kit. Results
 169 (sample ratio absorbance/cutoff value: Abs/CO) <0.9 were considered negative, ≥1
 170 positive and the grey zone was from ≥0.9 to <1.

171 Architect Chagas (CMIA). Testing was performed according to the manufacturer's
 172 instructions (Architect Chagas, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany). This fully
 173 automated assay is based on four hybrid recombinant proteins FP3, FP6, FP10, and TcF,
 174 which in aggregate represent 14 distinct antigenic regions (54, 55). Sera were not
 175 diluted. The chemiluminescent reaction is measured in relative light units (RLU).
 176 Results (sample RLU/cutoff value: S/CO) <0.8 were considered negative, ≥1 positive
 177 and the grey zone was from ≥0.8 to <1.

178 WB. The test was performed as described elsewhere (56). A total extract of *T. cruzi*
 179 (Maracay strain) lysate epimastigotes was used as the antigen. Sera were diluted 1:50 in
 180 TS with 1% skimmed milk and 0.2% Tween 20. The antigenic bands of the *T. cruzi*
 181 profile are: 28, 32, 38, 39, 40, and 48 KDa. A serum was considered positive when at
 182 least two bands of the pattern were recognized and also when a single band appeared if

183 it was as intense as the same band in the positive control, as used in other infectious
184 diseases such as Hepatitis C (INNO-LIA HCV Score, Gent, Belgium).

185 *Criteria for the interpretation of results.* An infant was considered infected with *T.*
186 *cruzi* when a positive RT-PCR was obtained and/or the level of IgG antibodies was
187 maintained during the first year of life by at least two serological tests.

188

189 **RESULTS**

190 From the 81 newborns included in the study, it was possible to obtain a sample
191 at birth to 1 month in 78 cases and the percentage of seropositivity in this first sample
192 was 97.4%. 14 out of 81 newborns were excluded from the follow-up study, as they
193 were unavailable for further sampling, resulting in a final panel of 67 infants.

194 Four out of the 67 infants were diagnosed as congenitally infected by *T. cruzi*
195 based on positive RT-PCR results at different times during the follow-up and a constant
196 level of IgG antibodies during the first year of life (Table 1). The remaining 63 were
197 considered not infected due to negative RT-PCR results and a drop in IgG antibodies.

198 In the four congenitally infected newborns (see Table 1), a trend towards a
199 reduction of antibodies was not perceived until treatment initiation, after which
200 antibodies began to decline, even disappearing in one infant (Case 3); additionally, RT-
201 PCR turned from positive to negative in all cases in which the assay was done. A
202 negative RT-PCR result was observed at birth in one of the infected infants (Case 4),
203 although the infection was confirmed at 12 months with both a positive RT-PCR result
204 and the maintenance of IgG antibody titres.

205 For all newborns, samples were grouped according to the age of the newborn
206 when the sample was collected. The percentages of sera with positive and gray-zone
207 results obtained by the five serological assays during the five follow-up periods of the

208 non-infected newborns are shown in Fig. 1. The details of the results obtained by each
209 serological assay during the follow-up of the non-infected newborns are shown in Fig.
210 2.

211 Although a continuous decreasing trend of the passive IgG antibodies in non-
212 infected newborns was observed over time, all serological assays still obtained at least
213 one gray-zone (ELISAr and CMIA) and/or positive result (IFAT, ELISAc, CMIA and
214 WB) at >9-12 months of age. Maternal antibodies disappeared completely at >12
215 months of age, except for one remaining gray-zone sample detected by the CMIA.

216 The WB pattern observed in mothers and non-infected and infected children was
217 very homogeneous (Fig. 3). In non-infected infants tested at birth, the serum pattern did
218 not show any differences with the mother (Fig. 3A), and the number of bands and their
219 intensity decreased during the follow-up, 80% testing negative at >6-9 months and all of
220 them negative at 12 months. In the congenital cases, no differences were observed in the
221 pattern between mother and newborn at birth, while some variation was apparent after a
222 few months. In Case 1, the bands showed a heterogeneous intensity 6 months after birth
223 (Fig. 3B) and in Case 4 these differences were observed at 15 months (Fig. 3E).

224 A proposed new strategy for the diagnosis of congenital Chagas disease is
225 presented as a flowchart in Fig. 4.

226

227 **DISCUSSION**

228 Screening programs for Chagas disease in pregnant Latin American women and
229 their children are still uncommon in non-endemic areas (7, 57). Several European
230 regions have implemented official prevention strategies to avoid the transmission of
231 congenital Chagas disease (44): Tuscany in Italy (45) and three autonomous
232 communities of Spain (Catalonia, Galicia and Valencia) (46, 48, 49). Official screening

233 programs implemented by European health authorities are summarized in Table 2. Other
234 regions, namely Andalusia and the Basque Country in Spain, recommend the screening
235 of all pregnant women susceptible to the disease (50, 51). The diversity of procedures
236 used in the control programs calls for the establishment of a uniform strategy suitable
237 for all laboratories and that would allow a prompt, efficient and cost-effective diagnosis
238 of congenital *T. cruzi* infection.

239 Since most of the samples included in the present study were obtained
240 retrospectively, not all patients could be followed during the first year of life and not all
241 the samples were analyzed by the five serological tests assayed due to absence or
242 insufficient volume. As expected, the proportion of positive sera in the first sample
243 (birth-1 month) was very high, in accordance with other authors (21), due to the
244 detection of IgG antibodies of maternal origin. On the contrary, 2.6% (2/78) of the
245 samples were negative, and all belonged to uninfected children. Of all the samples
246 analyzed, congenital Chagas disease was confirmed in only 6%. This rate of congenital
247 transmission is similar to others reported in different regions of Spain: Barcelona
248 (7.3%), Madrid (2.6%), Valencia (3.7%) and Biscay (5.8%) (21, 58–60). These results
249 do not significantly differ from endemic areas (12, 13, 16), although Howard et al.
250 (2014) (15) consider that endemic countries have higher rates of congenital
251 transmission.

252 All the official protocols published and implemented in Europe agree on the
253 inclusion of a parasitological test at birth and, with the exception of Catalonia, if the
254 result is negative, a new sample is analyzed one month later. In the Valencian protocol,
255 the re-test at 1 month is optional. The disadvantages of microscopic examination are
256 low sensitivity and high subjectivity, since it depends on the ability and training of the
257 observer to detect the parasite in the blood sample (39, 61). Both factors could lead to

258 parasites being missed in congenitally infected newborns (62). Another important point
259 is that the sample quality and storage play a key role in the results (35). In non-endemic
260 areas immediate observation of the sample is rare, and the low level of parasites and
261 their lack of mobility, directly related to the storage time, might contribute to false
262 negative results. The highly variable parasitic burden in neonates, the number of
263 replicates, and the time of observation are other important factors for consideration (38,
264 39). It should be also considered that congenital infection at any stage of pregnancy as
265 well as the perinatal transmission of *T. cruzi* may affect parasitemia (62, 63). Thus,
266 more sensitive methods are needed. These inconveniences for parasitological analysis
267 have also been described in primary health care facilities in rural endemic areas (31).

268 The capacity of molecular techniques such as PCR to detect a low amount of
269 parasites in blood can provide an early diagnosis (2, 64, 65). All the current screening
270 programs include a PCR at birth, except in Catalonia, and the test is repeated one month
271 later if the result is negative, except in Valencia, where it is optional. Additionally, in
272 the case of negative results, the protocols of Valencia and Galicia recommend another
273 PCR test between 7 and 9 months and at 9 months of age, respectively. At present, the
274 screening program of Catalonia is being updated and a PCR during the first month of
275 life has been included in the new revised protocol. The maximum parasitic load is found
276 one month after birth, when *T. cruzi* DNA from maternal transmission has disappeared
277 (25, 38, 39). Therefore, we propose a single PCR to be performed only at this age.

278 False negative results by PCR at birth cannot be disregarded: in our study, one of
279 the four infants with congenital *T. cruzi* infection tested negative with RT-PCR at birth
280 but serologically positive. In this particular case, the serology remained positive at 12
281 months and for this reason an additional RT-PCR was performed, which obtained a
282 positive result. Hence, a positive RT-PCR result from one month onwards confirms *T.*

283 *cruzi* infection, while a negative result at birth does not rule it out. This observation is in
284 accordance with Fumadó et al. (2014) (66), who describe a confirmed case of congenital
285 Chagas disease in a newborn with a negative RT-PCR.

286 Accordingly, the diagnostic algorithm could start directly at one month after
287 birth with a parasitological test or a PCR or both, depending on the laboratory facilities.
288 This would facilitate parasite detection and also avoid false positives resulting from the
289 presence of parasite DNA of maternal origin (7, 24, 67) (see Table 2 and Fig. 4).
290 However, the loss of contact with the mother and newborn after the post-delivery
291 discharge represents a major problem in areas without well-organized health care and
292 also when circuits between the different levels of health care (primary and hospital) are
293 not properly established (7). Consequently, our proposed algorithm includes as optional
294 the performance of a parasitological test at birth.

295 In reference to the serology, only the protocol of Tuscany takes into account a
296 sample at birth. In Valencia, the protocol does not clearly stipulate if this is required.
297 Alternatively, the protocols of Catalonia and Galicia choose to include the first serum
298 sample of the newborn at 9 months, unless the direct diagnosis has been conclusive at
299 birth or 1 month. If positive, all protocols, except that of Catalonia, include a follow-up
300 at 12 months. Available data indicate that maternal antibodies have disappeared from
301 the serum of the infant from 9 months after birth (31, 42, 66). A negative serology at
302 birth rules out infection (68), but as mentioned (62), the probability of this result is low
303 (2.6% in the present study). In the only two cases of newborns with a negative serology
304 at birth reported here, their mothers yielded a low level of antibody titres. On the other
305 hand, a positive result at birth, detected in most cases (97.4% in this study), does not
306 confirm the congenital infection (31, 69) and requires a second serological test at 9
307 months. Since the inclusion of a basal serology for all newborns from Chagas-infected

308 mothers would lead to a fairly high cost-effective ratio, we propose performing the first
309 serology at 9 months, an age when a negative result rules out Chagas disease. On the
310 contrary, the finding of antibody titres could mean congenital infection which should be
311 confirmed at around 12 months. Protocols that only include a sample at 9 months cannot
312 give conclusive results in case of seropositivity. The adoption of this protocol would
313 result in important savings due to the low number of infants requiring second sample
314 testing. In this study, positive values in non-chagasic infants remained in at least 20% of
315 the samples analyzed by all the serological assays at >6-9 months, except for CMIA,
316 which gave 60% positive samples. In the following period, >9-12 months, positive
317 serologies declined considerably. It should be noted that, despite a declining trend in
318 passive antibodies, none of the serological assays seroreverted in all the non-chagasic
319 infants. Finally, at >12 months of age, CMIA was the only test to give a sample in the
320 gray-zone.

321 In a previous study (70), our group reported that the CMIA Architect Chagas is a
322 highly effective assay for the diagnosis of chronic Chagas disease, with 100%
323 sensitivity, allowing most samples to be correctly diagnosed when applied as a single
324 technique. Other authors have reported similar sensitivity after evaluating the assay (71–
325 73). Nevertheless, precisely because of its high sensitivity, CMIA is not the most
326 suitable technique for the diagnosis of congenital Chagas disease. According to our
327 results, in comparison with the other tests, CMIA can detect more maternal IgG
328 antibodies in the serology of the newborn and for a longer term (see Fig. 1 and Fig. 2),
329 thus delaying the negativization of passive antibodies and impeding an early diagnosis
330 or discarding of the disease. Therefore, the age at which maternal antibodies disappear
331 from the serology of the newborn varies according to the test: the greater its sensitivity,
332 the longer passive antibodies are detectable (14).

333 In the present study, none of the serological methods were able to differentiate
334 between infected and non-infected newborns with the analysis of a single serum sample.
335 In the case of CMIA, however, it should be emphasized that in non-infected children at
336 >6-9 months, at which point we propose the first serological analysis, all samples
337 yielded results below 6 S/CO. This value was the cutoff that we established for chronic
338 Chagas disease when all results ≥ 6 are true positives, whereas only gray-zone and
339 positive sera with a result < 6 S/CO need to be confirmed by another serological assay
340 (70). In our study, CMIA results for the four congenitally infected newborns at >6-9
341 months were not available, but in two of the cases at >12 months they were far higher
342 than 6 S/CO. Further studies in this field involving a higher number of congenitally
343 infected newborns are needed.

344 The application of WB analysis did not provide any characteristic band to
345 distinguish between newborns with or without congenital *T. cruzi* infection, as in Riera
346 et al. (2006) (17). In the current study, a clear differentiation between patterns was
347 lacking, probably due to the low number of samples of congenitally infected newborns
348 analyzed in parallel with their mothers. The antibodies transferred from mother to child
349 may also have hidden the antibody production in the newborn (74) (Fig. 3D).
350 Nevertheless, differences in the intensity of bands and/or in the general pattern between
351 mother and newborn were evident after 6 months, when passive antibodies are already
352 scarce (Fig. 3B, 3C and 3E). Hence, WB analysis could be a useful tool to diagnose
353 congenital disease some months after birth in those laboratories where it is available.

354 In conclusion, in non-infected newborns a continuous decreasing trend of
355 passive IgG antibodies was observed but none of the serological assays seroreverted in
356 all the infants before 12 months. From 12 months onwards, all the serological tests
357 achieved negative results in the totality of the samples analyzed, with the exception of

358 the highly sensitive CMIA. On the contrary, in infants with congenital *T. cruzi* infection
359 the antibody decline was only detected after the initiation of the treatment.

360 In order to improve the diagnosis of congenital *T. cruzi* infection, we propose a
361 new more cost-effective strategy with a reduced number of tests. The protocol could
362 start at 1 month of age with a parasitological test and/or a PCR. If negative, a serology
363 would be carried out at 9 months, followed by a confirmatory serological testing at
364 around 12 months in case of positive results.

365

366 CONFLICT OF INTEREST

367 The authors declare that they have no conflict of interest.

368

369 ACKNOWLEDGMENTS

370 We thank Dr. Pere Coll for his support and helpful scientific discussions. This study
371 was partially supported by Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la
372 Informació de la Generalitat de Catalunya (2014SGR026) and Institut d'Investigació
373 Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau) and by Plan Nacional de I+D+i and Instituto de
374 Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación
375 Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research
376 in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) - co-financed by European Development
377 Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF. AA, ST, CB, MJP, EP, JG and MG
378 belong to the RICET, a Tropical Disease Cooperative Research Network in Spain (grant
379 number RD12/0018/0010).

380

381 FUNDING INFORMATION

382 This research received no specific grant from any funding agency in the public,
383 commercial, or not-for-profit sectors.

384

385

386 **REFERENCES**

- 387 1. **World Health Organization**. 2015. Chagas disease in Latin America: an
388 epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* **90**:33–44.
- 389 2. **Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron F**. 2012. Congenital parasitic
390 infections: A review. *Acta Trop* **121**:55–70.
- 391 3. **Organización Panamericana de la Salud**. 2006. Estimación cuantitativa de la
392 enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud
393 OPS/HDM/CD/425–06.
- 394 4. **Prata**. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect*
395 *Dis* **1**:92–100.
- 396 5. **Gascón J, Pinazo MJ**. 2008. Control de la transmisión vertical de *Trypanosoma*
397 *cruzi* en España: principal reto de la patología importada. *Enferm Infecc Microbiol*
398 *Clin* **26**:607–608.
- 399 6. **Buekens P, Almendares O, Carlier Y, Dumonteil E, Eberhard M, Gamboa-**
400 **Leon R, James M, Padilla N, Wesson D, Xiong X**. 2008. Mother-to-child
401 transmission of Chagas disease in North America: why don't we do more? *Matern*
402 *Child Health J* **12**:283–286.
- 403 7. **Oliveira I, Torrico F, Muñoz J, Gascón J**. 2010. Congenital transmission of
404 Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**:945–956.
- 405 8. **Schmunis GA**. 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries:
406 the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **102 Suppl 1**:75.
- 407 9. **Gascón J, Bern C, Pinazo MJ**. 2010. Chagas disease in Spain, the United States
408 and other non-endemic countries. *Acta Trop* **115**:22–27.

- 409 10. **Pinazo MJ, Gascón J.** 2015. The importance of the multidisciplinary approach to
410 deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta*
411 *Trop* **151**:16–20.
- 412 11. **Sicuri E, Muñoz J, Pinazo MJ, Posada E, Sánchez J, Alonso PL, Gascón J.**
413 2011. Economic evaluation of Chagas disease screening of pregnant Latin
414 American women and of their infants in a non endemic area. *Acta Trop* **118**:110–
415 117.
- 416 12. **Carlier Y, Torrico F.** 2003. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from
417 mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras*
418 *Med Trop* **36**:767–771.
- 419 13. **Torrico F, Alonso-Vega C, Suárez E, Rodríguez P, Torrico MC, Dramaix M,**
420 **Truyens C, Carlier Y.** 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy
421 outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected
422 newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* **70**:201–209.
- 423 14. **Bern C, Martin DL, Gilman RH.** 2011. Acute and congenital Chagas disease.
424 *Adv Parasitol* **75**:19–47.
- 425 15. **Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P.** 2014. Frequency of
426 the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-
427 analysis. *BJOG* **121**:22–33.
- 428 16. **Moscatelli G, Moroni S, García-Bournissen F, Ballering G, Bisio M, Freilij H,**
429 **Altcheh J.** 2015. Prevention of congenital Chagas through treatment of girls and
430 women of childbearing age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**:507–509.
- 431 17. **Riera C, Guarro A, El Kassab H, Jorba JM, Castro M, Angrill R, Gállego M,**
432 **Fisa R, Martín C, Lobato A, Portús M.** 2006. Congenital transmission of

- 433 *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. Am J Trop Med Hyg **75**:1078–
 434 1081.
- 435 18. **Guarro A, El-Kassab H, Jorba JM, Lobato A, Martín C, Castro M, Angrill R,**
 436 **Corcoy F, Riera C.** 2007. Un caso de transmisión congénita de la enfermedad de
 437 Chagas en Cataluña. Enferm Emerg **9 Suppl 1**: 28–30.
- 438 19. **Muñoz J, Portús M, Corachan M, Fumadó V, Gascón J.** 2007. Congenital
 439 *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. Trans R Soc Trop Med Hyg
 440 **101**:1161–1162.
- 441 20. **Flores-Chávez M, Faez Y, Olalla JM, Cruz I, Gárate T, Rodríguez M, Blanc P,**
 442 **Cañavate C.** 2008. Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case
 443 report. Case J **1**:302.
- 444 21. **Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, del Pino M, Fumadó V, Bosch J,**
 445 **Posada EJ, Hernández S, Fisa R, Bogueña JM, Gállego M, Sanz S, Portús M,**
 446 **Gascón J.** 2009. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi*
 447 infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in
 448 Barcelona, Spain. Clin Infect Dis **48**:1736–1740.
- 449 22. **Carrilero B, Quesada JJ, Alfayete S, Segovia M.** 2009. Enfermedad de Chagas
 450 congénita en recién nacido de madre de origen boliviano. Enferm Infecc Microbiol
 451 Clin **27**:486–487.
- 452 23. **Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A,**
 453 **Seixas J, Van Gool T, Cañavate C, Flores-Chávez M, Jackson Y, Chiodini PL,**
 454 **Albajar-Viñas P, Working Group on Chagas disease.** 2011. Chagas disease in
 455 European countries: The challenge of a surveillance system. Euro Surveill:
 456 **16**:pii=19968.

- 457 24. **Cevallos AM, Hernández R.** 2014. Chagas' disease: pregnancy and congenital
458 transmission. *Biomed Res Int* **2014**:401864.
- 459 25. **Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P.** 2015. Congenital Chagas
460 disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**:363–368.
- 461 26. **Grinnage-Pulley T, Scott B, Petersen CA.** 2016. A mother's gift: congenital
462 transmission of *Trypanosoma* and *Leishmania* species. *PLoS Pathog* **12**:e1005302.
- 463 27. **Bern C, Verastegui M, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cárdenas G,**
464 **Calderón M, Pacori J, Abastoflor MdC, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L,**
465 **Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH.** 2009. Congenital *Trypanosoma*
466 *cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* **49**:1667–1674.
- 467 28. **Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marín-Neto JA, Dantas**
468 **RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes**
469 **PA, Salvatella R, Moore AC.** 2007. Evaluation and treatment of Chagas disease in
470 the United States: a systematic review. *JAMA* **298**:2171–2181.
- 471 29. **Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, García-Bournissen F, Freilij H.** 2011.
472 Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas
473 disease. *Pediatrics* **127**:e212–218.
- 474 30. **Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S.** 2016. Current drug
475 therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop* **156**:1–16.
- 476 31. **Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H,**
477 **Albajar-Viñas P.** 2011. Congenital Chagas disease: recommendations for
478 diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS*
479 *Negl Trop Dis* **5**:e1250.

- 480 32. **World Health Organization**. 2012. Research priorities for Chagas disease, human
 481 African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser
 482 **975**:1–100.
- 483 33. **Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, Streiger**
 484 **M, Sosa-Estani S**. 2014. Trypanocide treatment of women infected with
 485 *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. PLoS Negl
 486 Trop Dis **8**:e3312.
- 487 34. **Montes-Rincón LM, Galaviz-Silva L, González-Bravo FE, Molina-Garza ZJ**.
 488 2016. *Trypanosoma cruzi* seroprevalence in pregnant women and screening by PCR
 489 and microhaematocrit in newborns from Guanajuato, Mexico. Acta Trop **164**:100–
 490 106.
- 491 35. **Torrico MC, Solano MA, Córdova M, Suarez E, Torrico F**. 2011. Diagnóstico
 492 parasitológico de la enfermedad de Chagas: de la teoría a la práctica. Enf Emerg **13**
 493 **Suppl 1**:33–38.
- 494 36. **Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij**
 495 **H**. 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and
 496 monitored by the polymerase chain reaction. J Antimicrob Chemoter **52**:441–449.
- 497 37. **Burgos JM, Altcheh J, Petrucelli N, Bisio M, Levin MJ, Freilij H, Schijman**
 498 **AG**. 2009. Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital
 499 transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. Diagn Microbiol
 500 Infect Dis **65**:58–61.
- 501 38. **Bua J, Volta BJ, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL**. 2012.
 502 Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite
 503 burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. Trans R Soc
 504 Trop Med Hyg **106**:623–628.

- 505 39. **Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio**
506 **AM, Cardoni RL.** 2013. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma*
507 *cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and
508 quantitative DNA amplification in congenitally infected children. PLoS Negl Trop
509 Dis **10**:e2476.
- 510 40. **Virreira M, Martínez S, Alonso-Vega C, Torrico F, Solano M, Torrico MC,**
511 **Parrado R, Truyens C, Carlier Y, Svoboda M.** 2006. Short report: Amniotic
512 fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J
513 Trop Med Hyg **75**:1082–1084.
- 514 41. **Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C.** 2007. Diagnóstico de
515 laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. Enferm Infecc Microbiol Clin
516 **25 Suppl 3**:29–37.
- 517 42. **World Health Organization.** 2002. Control of Chagas disease: second report of
518 the WHO expert committee. World Health Organ Tech Rep Ser **905**:1–109.
- 519 43. **Rodríguez P, Truyens C, Alonso-Vega C, Flores A, Córdova M, Suárez E,**
520 **Torrico F, Carlier Y.** 2005. Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-
521 *Trypanosoma cruzi* in samples of blood from newborns from mother with positive
522 serology for Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop **38 Suppl 2**: 62–64.
- 523 44. **Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J,**
524 **Muñoz J, Chagas disease COHEMI Working Group.** 2014. Health policies to
525 control Chagas disease transmission in European countries. PLoS Negl Trop Dis
526 **8**:e3245
- 527 45. **Consiglio Regionale Regione Toscana.** 2012. Programma regionale per la
528 prevenzione e il controllo della malattia di Chagas congenital. Servizio Sanitario
529 della Toscana, Regione Toscana, Firenze, Italy.

- 530 http://servizi.salute.toscana.it/csr/img/getfile_img1.php?id=24147. Accessed
531 November 8, 2016.
- 532 46. **Generalitat de Catalunya**. 2010. Protocolo de cribado y diagnóstico de la
533 enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés.
534 Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Barcelona, Spain.
535 [http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/chagas/documents/arxiu/chagas_espanyol.pdf)
536 [_salut/chagas/documents/arxiu/chagas_espanyol.pdf](http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/chagas/documents/arxiu/chagas_espanyol.pdf). Accessed November 8, 2016.
- 537 47. **Basile L, Oliveira I, Ciruela P, Plasencia A, Working Group for developing the**
538 **Catalonian screening programme for congenital transmission of Chagas**
539 **disease**. 2011. The current screening programme for congenital transmission of
540 Chagas disease in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* **16**:pii=19972.
- 541 48. **Xunta de Galicia**. 2014. Protocolo de cribado da enfermidade de Chagas en
542 mulleres embarazadas: Revisión ano 2014. Servizo Galego de Saúde, Consellería
543 de Sanidade, Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain.
544 [www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Protocolo-de-cribado-da-enfermidade-de-](http://www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Protocolo-de-cribado-da-enfermidade-de-chagas-en-mulleres-embarzadas-Actualizacion-2014)
545 [chagas-en-mulleres-embarzadas-Actualizacion-2014](http://www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Protocolo-de-cribado-da-enfermidade-de-chagas-en-mulleres-embarzadas-Actualizacion-2014). Accessed November 8,
546 2016.
- 547 49. **Generalitat Valenciana**. 2009. Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de
548 actuación en la Comunitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, Generalitat
549 Valenciana, Valencia, Spain.
550 <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/V-5243-2008.pdf>.
551 Accessed November 8, 2016.
- 552 50. **Junta de Andalucía**. 2014. Proceso Asistencial Integrado embarazo, parto y
553 puerperio. Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales, Junta de Andalucía,
554 Sevilla, Spain.

- 555 http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p_3_
556 [p_3_procesos_asistenciales_integrados/embarazo_parto_puerperio_nuevo/embaraz](http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p_3_)
557 [o_parto_puerperio_septiembre_2014.pdf](http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/csalud/galerias/documentos/p_3_). Accessed November 8, 2016.
- 558 51. **Gobierno Vasco**. 2008. Recomendaciones para la asistencia médica del adulto
559 inmigrante. Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Vitoria, Spain.
560 http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/osk_publicaciones/es_p
561 [ubli/adjuntos/primaria/asistenciaInmigrante.pdf](http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/osk_publicaciones/es_p). Accessed November 8, 2016.
- 562 52. **Pirón M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón**
563 **J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S**. 2007. Development of a real-time PCR
564 assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 103:195–200.
- 565 53. **Riera C, Vergés M, López-Chejade P, Pirón M, Gascón J, Gállego M, Portús**
566 **M**. 2009. Desarrollo y evaluación de una técnica ELISA con antígeno crudo de
567 *Trypanosoma cruzi* para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Enf Emerg*
568 11:22–29.
- 569 54. **Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW, Bryant**
570 **JD, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO**. 2006. Evaluation of a
571 prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully
572 automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. *Transfusion*
573 46:1737–1744.
- 574 55. **Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G,**
575 **Shah DO**. 2007. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental
576 test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin Vaccine*
577 *Immunol* 14:355–361.

- 578 56. **Riera C, Vergés M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M.** 2012.
 579 Short report: Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of
 580 *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg* **86**:412–416.
- 581 57. **Soriano-Arandes A, Angheben A, Serre-Delcor N, Treviño-Maruri B, Gómez i**
 582 **Prat J, Jackson Y.** 2016. Control and management of congenital Chagas disease in
 583 Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. *Trop Med*
 584 *Int Health* **21**:590–596.
- 585 58. **Flores-Chávez MD, Merino FJ, García-Bujalance S, Martin-Rabadán P,**
 586 **Merino P, García-Bermejo I, Delgado A, Cuadros J, Working Group on**
 587 **Chagas disease of Autonomous Community of Madrid.** 2011. Surveillance of
 588 Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. *Euro*
 589 *Surveill* **16**:pii=19974.
- 590 59. **Barona-Vilar C, Giménez-Martí MJ, Fraile T, González-Steinbauer C, Parada**
 591 **C, Gil-Brusola A, Bravo D, Gómez MD, Navarro D, Pérez-Tamarit A,**
 592 **Fernández-Silveira L, Fullana-Montoro A, Borrás R.** 2012. Prevalence of
 593 *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Latin American women and congenital
 594 transmission rate in a non-endemic area: the experience of the Valencian Health
 595 Programme (Spain). *Epidemiol Infect* **140**:1896–1903.
- 596 60. **Ávila Arzanegui O, Liendo Arenaza P, Martínez Indart L, Martínez Astorkiza**
 597 **T, Pocheville Guruceta MI, Egurbide Arberas MV.** 2013. Prevalencia de la
 598 infección por *Trypanosoma cruzi* y transmisión vertical en mujeres gestantes
 599 latinoamericanas en un área de salud de Vizcaya. *Enferm Infecc Microbiol Clin*
 600 **31**:210–216.
- 601 61. **Gebrekristos HT, Buekens P.** 2014. Mother-to-child transmission of
 602 *Trypanosoma cruzi*. *J Pediatric Infect Dis Soc* **3 Suppl 1**:S36–40.

- 603 62. **Zulantay I, Corral G, Guzmán MC, Aldunate F, Guerra W, Cruz I, Araya A,**
604 **Tapia V, Márquez F, Muñoz C, Apt W.** 2011. The investigation of congenital
605 infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: three protocols
606 explored in a pilot project. *Ann Trop Med Parasitol* **105**:123–128.
- 607 63. **Carlier Y, Truyens C.** 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of
608 interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and
609 fetuses. *Acta Trop* **151**:103–115.
- 610 64. **Díez CN, Manattini S, Zanuttini JC, Bottasso O, Marcipar I.** 2008. Short
611 report: The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas
612 disease in Northeastern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* **78**:624–627.
- 613 65. **Velázquez EB, Rivero R, De Rissio AM, Malagrino N, Esteva MI, Riarte AR,**
614 **Ruiz AM.** 2014. Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis
615 of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop* **137**:195–200.
- 616 66. **Fumadó V, Juncosa T, Posada E, Fisa R, Gállego M, Gascón J.** 2014. Chagas
617 pediátrico en zona no endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **32**:293–296.
- 618 67. **Norman FF, López-Vélez R.** 2014. Mother-to-child transmission of *Trypanosoma*
619 *cruzi* infection (Chagas disease): a neglected problem. *Trans R Soc Trop Med Hyg*
620 **108**:388–390.
- 621 68. **Luquetti AO, do Nascimento Tavares SB, da Rocha Siriano L, de Oliveira**
622 **RA, Campos DE, Alves de Moraes C, Chaves de Oliveira E.** 2015. Congenital
623 transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals
624 born to infected mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**:369–376.
- 625 69. **Chippaux JP, Salas Clavijo AN, Santalla JA, Postigo JR, Schneider D, Brutus**
626 **L.** 2010. Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi*
627 treated with benznidazole. *Trop Med Int Health* **15**:87–93.

- 628 70. **Abras A, Gállego M, Llovet T, Tebar S, Herrero M, Berenguer P, Ballart C,**
 629 **Martí C, Muñoz C.** 2016. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it
 630 time for a Change? *J Clin Microbiol* **54**:1566–1572.
- 631 71. **Praast G, Herzogenrath J, Bernhardt S, Christ H, Sickinger E.** 2011.
 632 Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. *Diagn Microbiol*
 633 *Infect Dis* **69**:74–81.
- 634 72. **Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-**
 635 **Hernández M.** 2012. ARCHITECT Chagas®: una nueva herramienta diagnóstica
 636 en la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **30**:463–465.
- 637 73. **Holguín A, Norman F, Martín L, Mateos ML, Chacón J, López-Vélez R,**
 638 **Pérez-Molina JA.** 2013. Dried blood as an alternative to plasma or serum for
 639 *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol*
 640 **20**:1197–1202.
- 641 74. **López-Chejade P, Fisa R, Gállego M, Iniesta L, Riera C, Portús M, RIVEMTI.**
 642 2005. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la población procedente de zona
 643 endémica en Barcelona. Valoración de las pruebas de diagnóstico utilizadas.
 644 *Enferm Emerg* **8 Suppl 1**:32–34.
- 645

646 TABLES

647 Table 1. Congenitally infected infants (n = 4).

	PCR	IFAT (Dilution)	ELISAc (U)	ELISAr (Abs/CO)	CMIA (S/CO)	WB (KDa bands)	
Case 1	Mother	-	≥1:5120	169	8.39	12.31	6/6
	Birth-1 month	-	1:2560	-	8.52	-	-
	>1-6 months	-	1:640	76	6.82	7.97	5/6 (28/32/38/39/40)
	>6-9 months	-	1:640	-	7.47	-	-
	>9-12 months	Pos	1:640	-	6.67	-	-
	1 month Pt.	-	1:640	-	8.70	-	-
	12 months Pt.	-	1:80	42	1.63	3.57	0/6
Case 2	Mother	Pos	1:1280	200	7.60	11.07	5/6 (28/32/38/39/40)
	>12 months	Pos	1:1280	162	5.99	12.04	5/6 (28/32/38/39/40)
	During Tr.	Neg	-	164	5.96	11.78	3/6 (28/32/38)
	5 months Pt.	Neg	-	116	5.11	10.29	3/6 (28/32/38)
	16 months Pt.	Neg	1:160	89	3.87	8.25	1/6 (32)
	3 years Pt.	Neg	-	66	2.07	8.07	1/6 (32)
	4 years Pt.	Neg	1:80	54	1.35	7.66	0/6
Case 3	Mother	Pos	1:2560	178	5.78	10.9	5/6 (28/32/38/39/40)
	Birth-1 month	Pos	1:1280	279	5.56	11.22	5/6 (28/32/38/39/40)
	1 day Pt.	-	1:320	95	3.52	5.02	3/6 (32/38/40)
	2 years Pt.	Neg	-	8	0.2	-	-
Case 4	Mother	Pos	1:1280	159	2.65	12.81	5/6 (28/32/38/39/40)

RESULTADOS CAPÍTULO 2

Birth-1 month	Neg	1:1280	141	3.1	-	-
>12 months	Pos	1:1280	143	6.41	11.64	5/6
(28/32/38/39/40)						
7 months Pt.	Neg	1:320	105	5.77	7.21	5/6
(28/32/38/39/40)						

648

649 Pt., post-treatment; Tr., treatment; Pos, positive; Neg, negative; (-), not done.

650

651 **Table 2. Prevention strategies against the transmission of congenital Chagas**

652 **disease implemented by European regions.**

		Parasitological test		PCR				Serology				
		Birth	1m	Birth	1m	7m	9m	Birth	1m	7m	9m	12m
Spain	Catalonia, 2010 (46)	✓ ^M	×	×	×	×	×	×	×	×	✓	×
	Valencia, 2009 (49)	✓ ^{M,S}	○	✓	○	○		?	×	✓		✓
	Galicia, 2014 (48)	✓	✓	✓	✓	×	✓	×	×	×	✓	✓
Italy	Tuscany, 2012 (45)	✓ ^T	✓	✓	✓	×	×	✓	×	×	✓	✓
	Proposal	○	✓	×	✓	×	×	×	×	×	✓	✓*

653

654 Ticks (✓) indicate the tests and periods included in the protocols. Crosses (×) indicate

655 the tests and periods not included in the protocols. Open circles (○) indicate the tests

656 and periods included as optional in the protocols. 1m, 1 month; 7m, 7 months; 9m, 9

657 months; 12m, 12 months; *, only in case of a positive serology at 9 months of age; M,

658 micromethod; S, Strout method; T, thin or thick blood smear.

659

660 **FIGURE LEGEND**

661 **Fig. 1. Percentages of sera with positive and gray-zone results obtained by the five**
662 **serological assays during the follow-up of the non-infected newborns.** n, number of
663 sera analyzed.

664

665 **Fig. 2. Results obtained by each serological assay during the five follow-up periods**
666 **of the non-congenital newborns: IFAT (A), ELISAc (B), ELISAr (C), CMIA (D)**
667 **and WB (E).** Dashed lines represent the cutoff value established for each test: dilution
668 1:40 for IFAT (A), 20 units for ELISAc (B), 1 absorbance/cutoff value for ELISAr (C),
669 1 relative light unit/cutoff value for CMIA (D), and a single band of the pattern (28, 32,
670 38, 39, 40 or 48 KDa) when it is as intense as the same band in the positive control for
671 WB (E). Dotted lines indicate the mean of the results obtained in each period of the
672 follow-up and continuous lines represent the standard deviation (SD). Crosses (×) in
673 panel E indicate samples considered as negative because they showed a band of the
674 pattern but not as strong as in the positive control.

675

676 **Fig. 3. Examples of the WB pattern of bands recognized in the newborns studied**
677 **and their mothers. Non-infected (A) and congenitally infected children: case 1 (B),**
678 **case 2 (C), case 3 (D) and case 4 (E).**

679 Positive control (C+), mother (M), days (d), months (m), years (y), post-treatment (Pt).

680 *Samples of the mother and newborn could not be analyzed in parallel in the same
681 nitrocellulose membrane due to insufficient volume.

682

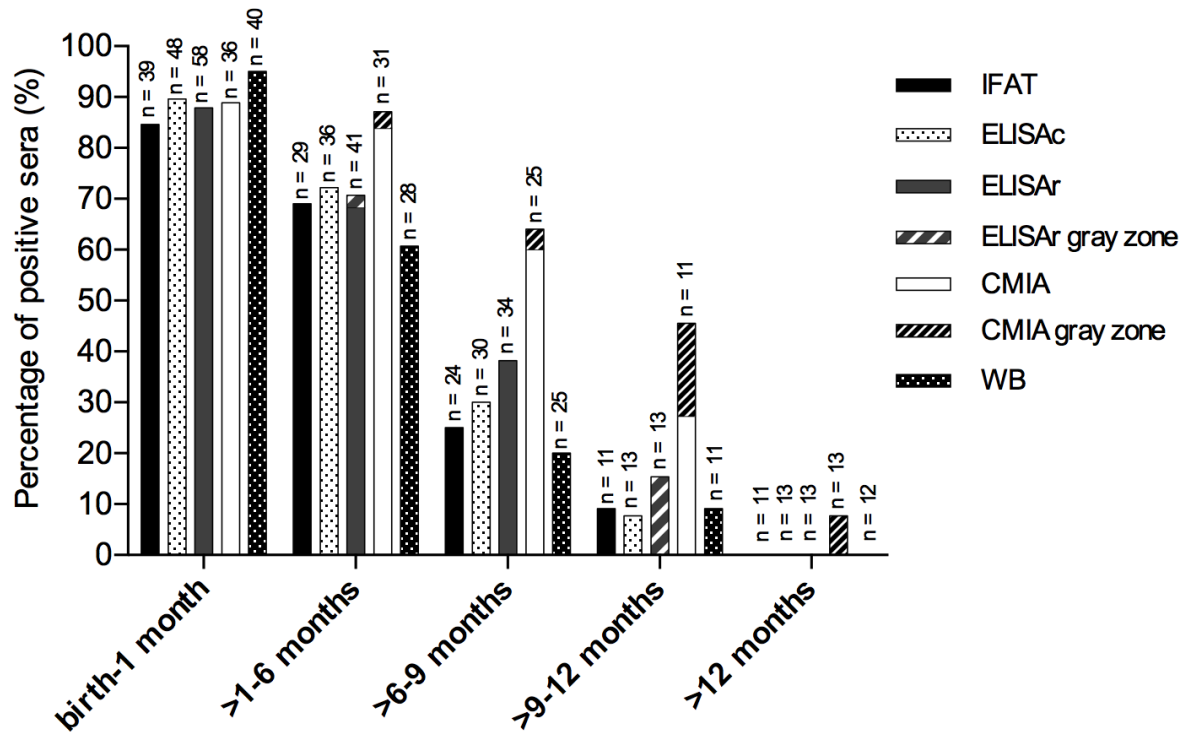
683

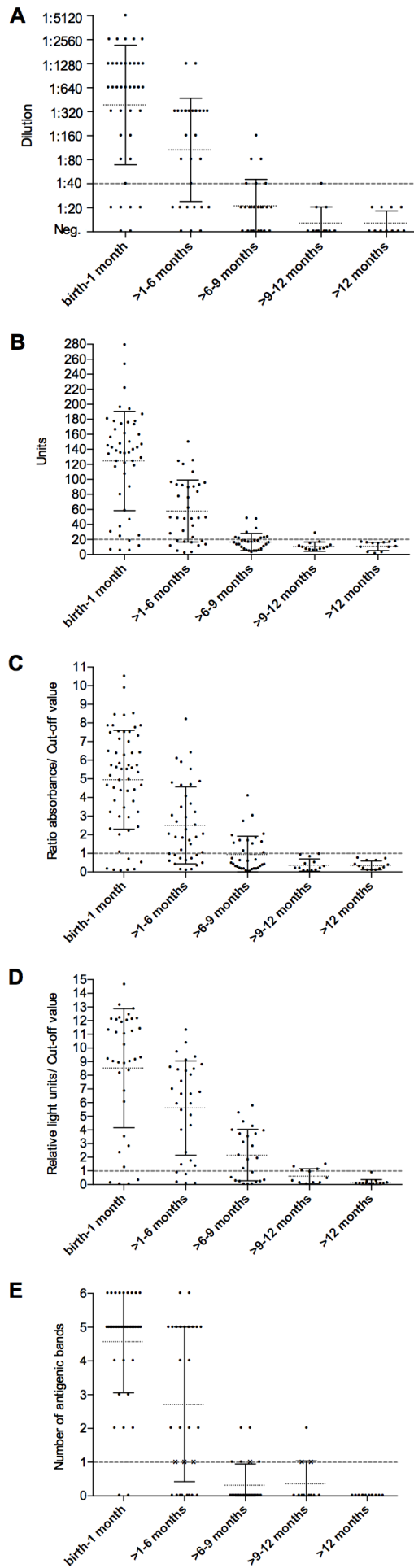
684 **Fig. 4. Proposal of a new strategy for the diagnosis of congenital Chagas disease.**

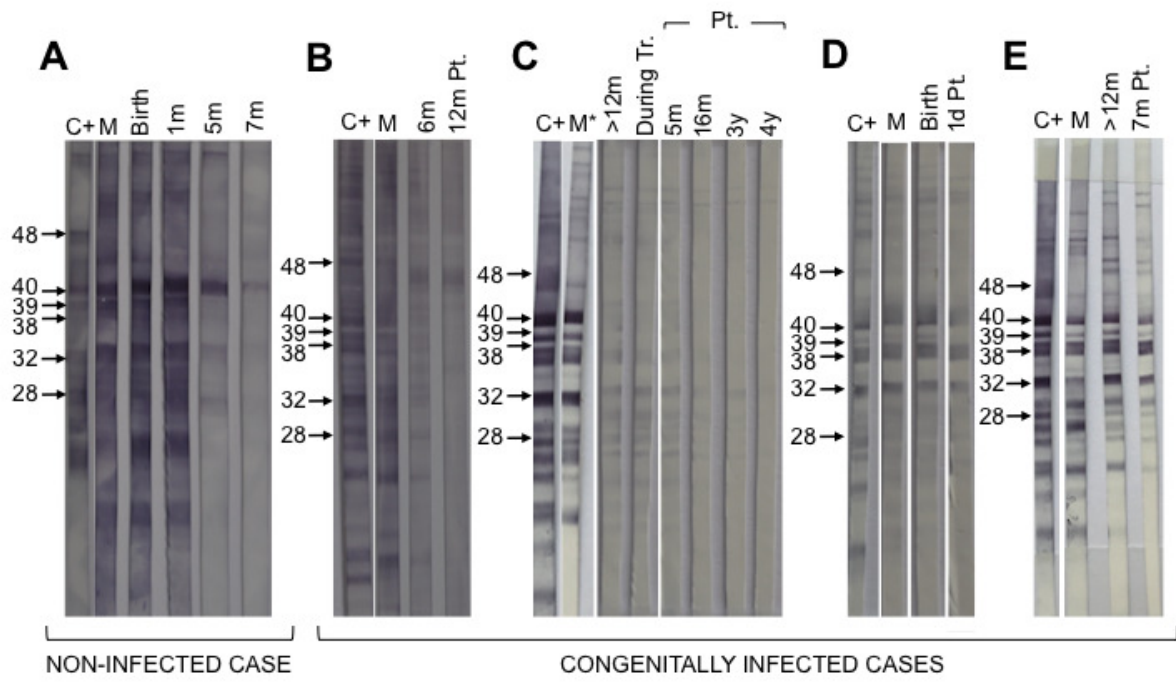
685 *Infection is considered congenital with a positive result in any of the tests (PCR and/or

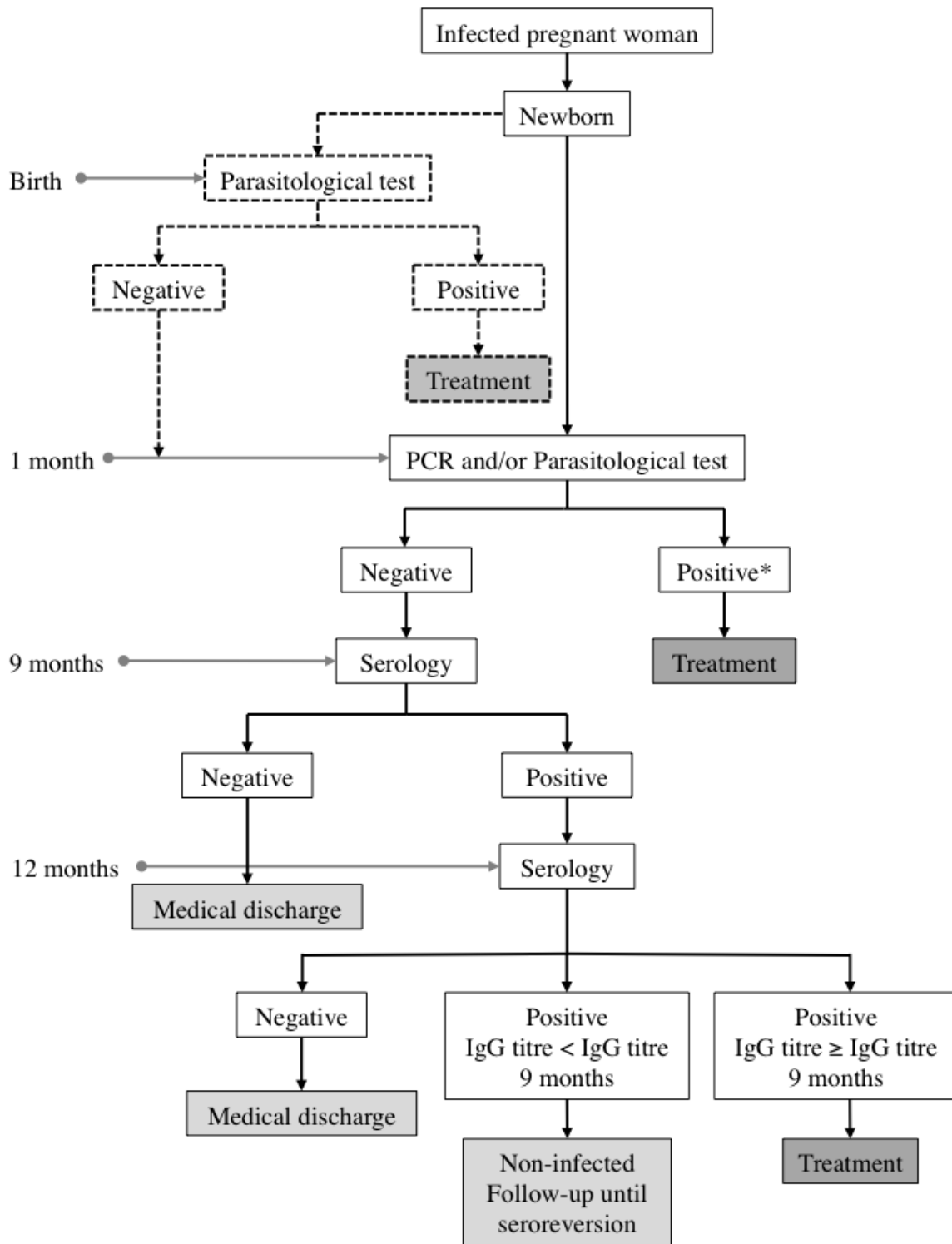
686 parasitological test). Dashed line indicates that the test is included as optional in the

687 flowchart.









CAPÍTULO 3

Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing
Units (DTUs) in Latin-American migrants in
Barcelona (Spain)

IDENTIFICACIÓN DE LAS UNIDADES DISCRETAS DE TIPIFICACIÓN (UDTs)
DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN UNA POBLACIÓN DE MIGRANTES LATINO-
AMERICANOS ATENDIDOS EN BARCELONA (ESPAÑA)

Alba Abras, Montserrat Gállego, Carmen Muñoz, Natalia A Juiz, Juan Carlos Ramírez, Carolina I Cura, Silvia Tebar, Anna Fernández-Arévalo, María-Jesús Pinazo, Leonardo de la Torre, Elizabeth Posada, Ferran Navarro, Paula Espinal, Cristina Ballart, Montserrat Portús, Joaquim Gascón, Alejandro G Schijman

PARASITOLOGY INTERNATIONAL 2017, Vol. 66, p. 83-88

Factor de impacto: 1,860

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, se divide en seis Unidades Discretas de Tipificación (UDTs): TcI-TcVI. Nuestro objetivo fue identificar las UDTs de *T. cruzi* en migrantes en el área de Barcelona (España) y evaluar diferentes métodos moleculares de tipificación para la caracterización de los genotipos de *T. cruzi*. Se analizaron 75 muestras de sangre periférica mediante dos métodos de PCR a tiempo real (qPCR) basados en el ADN satélite (ADNsat) y el ADN del quinetoplasto (ADNk). Las 20 muestras que obtuvieron un resultado positivo por ambos métodos, todas procedentes de individuos de Bolivia, se sometieron a la caracterización de las UDTs mediante dos diagramas de flujo basados en PCR: qPCR multiplex con sondas TaqMan (MTq-PCR), y PCR convencional. Estas muestras también fueron estudiadas mediante la secuenciación del ADNsat y clasificadas en tipo I (TcI/III), tipo II (TcII/IV) y tipo híbrido I/II (TcV/VI). Diez de las 20 muestras dieron resultados positivos en los diagramas: TcV (5 muestras), TcII/V/VI (3) y infecciones mixtas de TcV más TcII (1) y TcV más TcII/VI (1). Mediante la secuenciación del ADNsat, pudimos clasificar las 20 muestras, 19 como tipo I/II y una como tipo I. La UDT más frecuente identificada por los dos diagramas de flujo, y sugerida por la secuenciación del ADNsat en el resto de muestras con cargas parasitarias bajas, TcV, es común en Bolivia y predominante en sangre periférica. La infección mixta TcV-TcII fue detectada por primera vez de manera

simultanea en migrantes bolivianos. Los diagramas basados en PCR son muy útiles para caracterizar las UDTs durante la fase aguda de la infección. El análisis de las secuencias de ADNsat no permiten discriminar las poblaciones de *T. cruzi* a nivel de una única UDT pero nos permite incrementar el número de casos caracterizados en pacientes con infección crónica.



Contents lists available at ScienceDirect

Parasitology International

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

Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)



Alba Abras^{a,b,c,1}, Montserrat Gállego^{a,b,*,1}, Carmen Muñoz^{d,e,f,1}, Natalia A Juiz^g, Juan Carlos Ramírez^g, Carolina I Cura^g, Silvia Tebar^{a,b}, Anna Fernández-Arévalo^{a,b,e}, María-Jesús Pinazo^b, Leonardo de la Torre^b, Elizabeth Posada^b, Ferran Navarro^{d,e,f}, Paula Espinal^e, Cristina Ballart^{a,b}, Montserrat Portús^a, Joaquim Gascón^b, Alejandro G Schijman^{g,1}

^a Secció de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain

^b ISGlobal, Barcelona Centre for International Health Research (CRESIB), Roselló 134-4^o, 08036 Barcelona, Spain

^c Laboratori d'Ictologia Genètica, Departament de Biologia, Universitat de Girona, Campus de Montilivi, 17071 Girona, Spain

^d Servei de Microbiologia, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Quinti 89, 08041 Barcelona, Spain

^e Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Sant Antoni Maria Claret 167, 08025 Barcelona, Spain

^f Departament de Genètica i Microbiologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

^g Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh), Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres" (INGEBI-CONICET), Vuelta de Obligado 2490-2^o, C1428ADN Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 September 2016

Received in revised form 24 November 2016

Accepted 5 December 2016

Available online 07 December 2016

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Discrete Typing Unit

Migration

Real-time PCR

Sequencing

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease, is divided into six Discrete Typing Units (DTUs): TcI–TcVI. We aimed to identify *T. cruzi* DTUs in Latin-American migrants in the Barcelona area (Spain) and to assess different molecular typing approaches for the characterization of *T. cruzi* genotypes. Seventy-five peripheral blood samples were analyzed by two real-time PCR methods (qPCR) based on satellite DNA (SatDNA) and kinetoplastid DNA (kDNA). The 20 samples testing positive in both methods, all belonging to Bolivian individuals, were submitted to DTU characterization using two PCR-based flowcharts: multiplex qPCR using TaqMan probes (MTq-PCR), and conventional PCR. These samples were also studied by sequencing the SatDNA and classified as type I (TcI/III), type II (TcII/IV) and type I/II hybrid (TcV/VI). Ten out of the 20 samples gave positive results in the flowcharts: TcV (5 samples), TcII/V/VI (3) and mixed infections by TcV plus TcII (1) and TcV plus TcII/VI (1). By SatDNA sequencing, we classified the 20 samples, 19 as type I/II and one as type I. The most frequent DTU identified by both flowcharts, and suggested by SatDNA sequencing in the remaining samples with low parasitic loads, TcV, is common in Bolivia and predominant in peripheral blood. The mixed infection by TcV–TcII was detected for the first time simultaneously in Bolivian migrants. PCR-based flowcharts are very useful to characterize DTUs during acute infection. SatDNA sequence analysis cannot discriminate *T. cruzi* populations at the level of a single DTU but it enabled us to increase the number of characterized cases in chronically infected patients.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease is a parasitic infection caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*. Traditionally linked to rural areas of Central and South America, with approximately 6 million people currently affected [1], the disease has become widespread in Europe and the United States as a consequence of migratory trends [2–4]. Spain is the second country with the largest number of migrants from Latin America after

the United States, as well as the European country with the highest Chagas disease burden [5,6].

In the absence of the triatomid vector, *T. cruzi* can be transmitted in non-endemic areas through blood transfusion, organ transplant, congenital transmission, and laboratory accidents [7,8]. Chagas disease occurs in two phases: the acute form, usually without symptoms, and the chronic form, characterized by cardiac or gastrointestinal disorders. However, *T. cruzi*-infected individuals can remain for years or even all their lives in a chronic silent phase of the disease known as the indeterminate form [1,9].

T. cruzi has great genetic diversity and its natural populations are currently divided into six genetic subdivisions, known as Discrete Typing Units (DTUs), which have different geographical distribution: TcI–TcVI [10,11]. The concept of DTUs refers to a set of stocks that are

* Corresponding author at: Secció de Parasitologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII 27-31, 08028 Barcelona, Spain.

E-mail address: mgallego@ub.edu (M. Gállego).

¹ These authors have contributed equally to the study.

genetically more similar to each other than to any other stock, and are identifiable by common genetic, molecular or immunological markers [10,12]. Taxonomic studies have sought to identify associations between DTUs and the clinical presentation of Chagas disease, as well as clarify the geographical distribution of *T. cruzi* genetic subdivisions in endemic regions and transmission cycles [13–15]. There are several methods to characterize *T. cruzi* DTUs, but to date there is no consensus on a genotyping protocol [16].

The aims of this study were to identify *T. cruzi* DTUs in a population of migrants from Chagas disease endemic countries attending different hospitals in the Barcelona area (Spain), and to assess different molecular typing approaches for the characterization of *T. cruzi* genotypes.

2. Material and methods

2.1. Study population and samples

A total of 75 peripheral blood samples from Latin American migrants who attended seven hospitals in the Barcelona area (Spain) during the period October 2009 to February 2014 were included. Selection criteria included patients with request for Chagas disease diagnosis and sufficient sample volume stored to perform the subsequent analysis. Samples were anonymized before being evaluated. Two real-time polymerase chain reaction procedures (qPCR) to detect *T. cruzi* DNA were used and samples yielding positive results in both methods were selected to investigate the parasite DTUs.

This study was approved by the Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau in Barcelona (Project code: IIBSP-CHA-2013-33; CEIC number: 53/2013).

2.2. DNA extraction and real-time PCR procedures

DNA was extracted from 200 µL of EDTA-blood with the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Mannheim, Germany) and eluted in 200 µL of elution buffer (EB) according to the manufacturer's instructions. The extracted DNA was stored at –40 °C until its analysis. Techniques used for the inclusion criteria were two qPCR assays detecting satellite DNA (SatDNA) (primers *Cruzi* 1 and *Cruzi* 2, and probe *Cruzi* 3) [17], and kinetoplastid DNA (kDNA) (primers 32F and 148R, and probe 71P) [18] of *T. cruzi*. Five µL of the DNA eluates in a final volume of 20 µL were used in both SatDNA and kDNA qPCR procedures. The amplification was carried out in a Rotor-Gene thermal cycler (RG6000, Corbett & CO, Teddington, United Kingdom). RNase P human gene (TaqMan RNase P Control Reagents Kit, Applied Biosystems) was included as an internal control of the qPCR amplification and also to evaluate the extracted DNA integrity [19].

For quantification, standard curves were built using non-chagasic human blood spiked with cultured epimastigotes of *T. cruzi*. Ten milliliters of non-infected blood were spiked with *T. cruzi* TcV LLO 52-P39-R1-Cl1 stock, giving a final concentration of 10⁵ parasite equivalents/mL (par. eq./mL). DNA from spiked blood used to construct the standard curve was extracted in the same way as described above for clinical samples. In order to obtain a panel of samples ranging from 10⁵ to 1 par. eq./mL of blood, 1/10 serial dilutions of the DNA extracted from the spiked blood in total DNA extractions from non-chagasic individuals were carried out.

2.3. *T. cruzi* DTU characterization

DTU characterization was performed using two sequential flowcharts based on molecular markers in the following order: (i) multiplex real-time PCR using TaqMan probes (MTq-PCR) in which the DTU is resolved after one or two rounds of amplification of the Spliced Leader Intergenic Region (SL-IR), 18S-ribosomal DNA (18S), Cytochrome Oxidase II (COII), and 24Sα-ribosomal DNA (24Sα), as reported [16] (Fig. 1); (ii) a conventional PCR flowchart, which requires at least

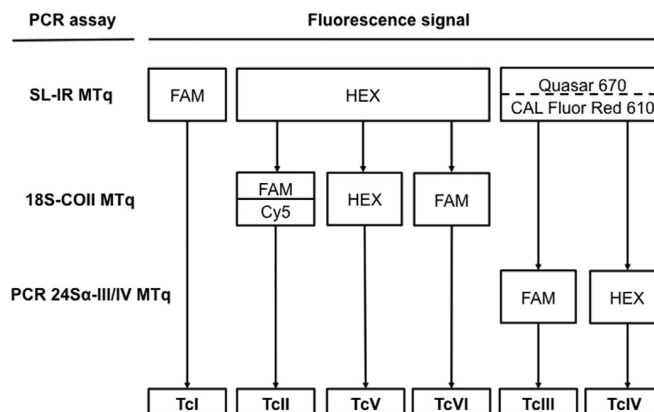


Fig. 1. Multiplex real-time PCR (MTq-PCR) flowchart for identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs). SL-IR: Spliced Leader Intergenic Region; 18S: 18S-ribosomal DNA; COII: Cytochrome Oxidase II; 24Sα: 24Sα-ribosomal DNA. Continuous line indicates the need for reactivity in both FAM and Cy5 fluorescence signals. Dotted line indicates the need for reactivity in at least one out of the two signals (Quasar 670 and CAL Fluor Red 610).

The flowchart was taken from Cura et al. [16].

three independent and sequential amplifications of the nuclear loci SL-IR, 24Sα, and A10 fragment (A10), as described elsewhere [20,21] (Fig. 2). The conventional PCR flowchart needs a subsequent electrophoresis in agarose gels in order to visualize the amplicon sizes (base pairs, bp). Samples already characterized at the level of a single DTU by MTq-PCR were not re-analyzed with the conventional PCR flowchart.

2.4. *T. cruzi* satellite DNA sequencing

A PCR procedure, targeted to the *T. cruzi* SatDNA, was performed in 50 µL reaction volume containing 5 µL of extracted DNA. Final concentrations were: 200 µM of each deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP), 1 µM of each primer *Cruzi* 1 and *Cruzi* 2 [17], 1.5 U of VWR Taq DNA polymerase (VWR International, Haasrode, Belgium), and 5 µL of 10× Key buffer (supplied with the VWR Taq polymerase). Amplification conditions were as follow: one step of 3 min at 94 °C, 44 cycles at 94 °C for 45 s, 66 °C for 45 s and 72 °C for 45 s; and a final extension step at 72 °C for 10 min. PCR products were detected by agarose gel electrophoresis (2%) stained with ethidium bromide through its observation with ultraviolet light (UV). Amplified fragments were purified with USB ExoSAP-IT PCR Product Clean-up (Affymetrix, Inc. USB Corporation, Cleveland, Ohio, USA), and sequenced (Genomics, Scientific and Technological Centers, Universitat de Barcelona, Spain). Sequences were analyzed using MEGA 6 software (<http://www.megasoftware.net>) in order to classify them in SatDNA type I, SatDNA type II (or type I/II hybrid) according to the position of a set of single nucleotide polymorphisms [SNPs] observed and studied in the SatDNA sequence) [22, 23] (Ramírez et al., unpublished results). Sequence data were deposited at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) with consecutive accession numbers KX235520 to KX235539.

3. Results and discussion

T. cruzi characterization studies are common in endemic countries in contrast to in non-endemic areas such as Europe. In Spain, they are scarce [24,25], and have not included newborns as in the present work.

Seventy-five peripheral blood samples were analyzed. Twenty of them tested positive for *T. cruzi* DNA using both SatDNA and kDNA qPCR methods. They belonged to 14 adults, two children aged 10 and 13, and four newborns to Chagas-infected mothers. All adults were Bolivian, in accordance with the high prevalence of Bolivian people in other studies on Chagas disease in Spain [3,26]. The four newborns and both children were born in Spain but their mothers came from

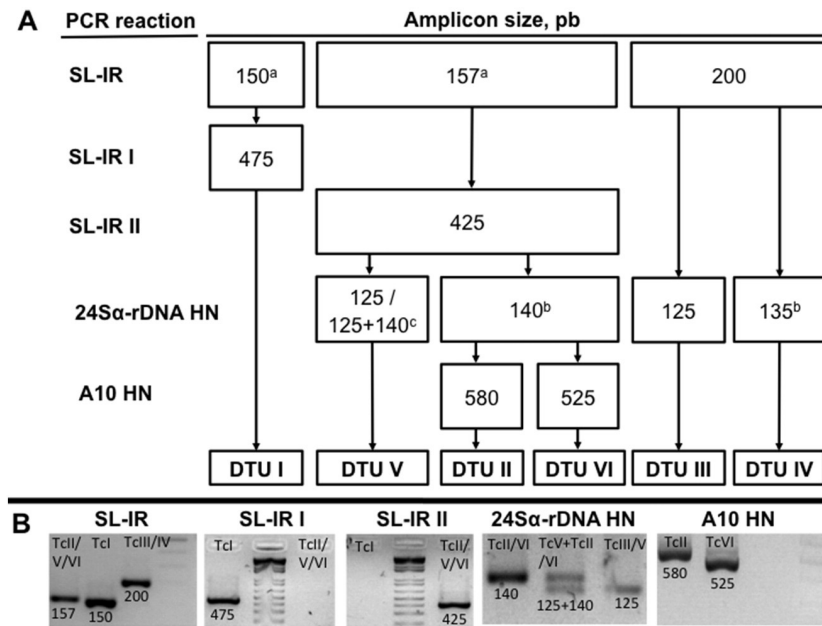


Fig. 2. Conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) flowchart for identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) (A). Amplicon size is indicated in bp (base pairs). SL-IR: Spliced-Leader Intergenic Region; SL-IR I and II: PCR reaction from SL-IR I and II PCR; 24S α rDNA HN: heminested amplification of the D7 domain of the 24S α ribosomal RNA genes; A10 HN: heminested reaction for the A10 fragment. Examples of the PCR products obtained for each DTU by agarose gel electrophoresis in the reactions of the identification flowchart (B). The flowchart was taken and adapted from Burgos et al. [20] and Burgos et al. [21]. ^aSometimes bands of 150 and 157 bp may be difficult to differentiate and could appear as a single band. ^bBands of 135 and 140 bp could also be difficult to differentiate. ^cIn cases where both 125 and 140 bp 24S α rDNA HN amplicons are obtained, we interpreted TcV when a band of 125 bp plus a weak 140 bp fragment appeared and mixed infections by TcV plus TcII/VI when a band of 125 bp plus a strong 140 bp fragment were obtained, as done before [56,57].

Bolivia and consequently were congenitally infected. Of the remaining 55 samples, 54 of them tested negative for both qPCR diagnostic methods and the last one was negative for SatDNA qPCR and positive for kDNA qPCR. The discordant sample achieved a parasitic load for kDNA qPCR below the limit of detection (LOD) of the method (0.23 par. eq./mL) [19] and belonged to an Argentinian patient with chronic asymptomatic Chagas disease. These results are consistent with those of Ramirez et al. [19], which reported that kDNA qPCR had higher analytical sensitivity than SatDNA qPCR method.

Ten out of the 20 blood samples selected for the parasite characterization gave positive results in the DTU identification flowcharts (Table 1). Five of these were identified as belonging to a particular *T. cruzi* DTU, in all cases TcV. In other three patients, the characterization gave a TcII/V/VI profile, since the 24S α yielded undetectable results. The remaining two samples presented mixed infections, one by TcV plus TcII/VI and the other one by TcV plus TcII, discriminated using A10 genomic fragment (Fig. 1–Supplementary material). The combination of TcV plus TcII has already been reported in Bolivian migrants but not simultaneously, as TcV was detected before treatment and TcII after treatment [25]. This is the first time that a mixed infection by TcV plus TcII has been observed in a blood sample of a patient at the same time.

With regard to the typification method, the MTq-PCR flowchart characterized five samples: three belonged to TcV and two to TcII/V/VI genotypes. When using the conventional PCR flowchart, two samples were typified as TcV, two as TcII/V/VI, one as TcV plus TcII/VI and the last one as TcV plus TcII (previously identified as TcII/V/VI by the MTq-PCR method). The lesser extent of MTq-PCR to detect mixed infections in comparison with the conventional PCR scheme has been previously observed by Cura et al. [16].

In relation to the *T. cruzi* SatDNA sequencing, it was possible to obtain the 166 bp tandem repeated sequences of the 20 samples analyzed. SatDNA based PCR is more sensitive than the PCR assays used for DTU identification, due to the high copy number of the satellite repeats (10⁵) present in the genome of the parasite [15,22,27,28]. It is expected to find samples from chronic Chagas disease patients with parasitic loads below the LOD of the PCR typing methods but above that of

SatDNA based PCR. The 95% of the samples, 19 of them, showed SatDNA type I/II hybrid (see Table 1). The remaining sample (GenBank accession number KX235536) (5%) had SatDNA type I. Samples of type II were not found [23] (Ramírez et al., unpublished results). This is consistent with the findings obtained with the PCR-based flowcharts.

The most widespread and abundant *T. cruzi* DTU in Latin America is TcI, which is associated with human Chagas disease in northern South America but is also occasionally reported in the Southern Cone [29–31]. TcV, as well as TcII and TcVI, seems to be concentrated in central and southern South America and restricted to domestic transmission cycles [11,31,32]. In reference to the remaining DTUs, TcIII is rare in humans and associated with sylvatic cycles and TcIV occurs only sporadically in South America, with the exception of Venezuela [11]. In this study, we identified TcV in most cases, in agreement with previous studies of Bolivian patients in Madrid (Spain) [24,25]. In fact, TcV, together with TcI, are the most common DTUs in domestic cycles in Bolivia [33]. Although we found no TcI by using the *T. cruzi* characterization flowcharts, one of the SatDNA sequences had a type I profile which is related to DTUs TcI and TcIII [23]. Despite the presence of TcIII cannot be ruled-out, chances are that the only SatDNA type I sequence identified belongs to a TcI because of its abundance in the Americas [31]. Other authors have not found any TcIII in their studies of Bolivian patients in Spain [24,25].

Another point to consider is the fact that 19 out of the 20 sequences obtained a profile SatDNA I/II hybrid associated to DTUs TcV–TcVI. In this case, these sequences are most likely to come from TcV, predominant in Bolivia [33] and, moreover, five out of the ten samples with positive results in the flowcharts were characterized as TcV. We have also found the presence of TcV plus TcII and TcV plus TcII/VI indicating mixed infections, which have been described as frequent in *T. cruzi* including a combination of different DTUs [33–35]. In Spain, they were detected in Bolivian patients with chronic Chagas disease in the 15% of the samples [25]. As mentioned above, TcII and TcVI are associated with domestic cycles in the Southern Cone [11]. Thus, this type of combined infections cannot be discarded in the rest of the samples studied.

Table 1
Results obtained for the 20 blood samples of Bolivian patients included in the study.

Year	Sex (M, F)	Age (d, m, y)	Symptoms (A, C, D)	Treatment ^a (yes, no)	SatDNA qPCR			kDNA qPCR			DTU		SatDNA sequence type
					Ct	Par. eq./mL ^b	Log ₁₀ par. eq./10 mL	Ct	Par. eq./mL ^c	Log ₁₀ par. eq./10 mL	MTq-PCR	Conv. PCR	
2013	F	1m	A	No	18.1	937.7	4.0	17.6	300.7	3.5	TcV	NP	I/II
2010*	M	10m	A	No	19.0	529.4	3.7	15.3	1686.0	4.2	NP	TcV + II/VI	I/II
2009	M	21d	A	No	20.6	136.2	3.1	20.7	32.3	2.5	TcV	NP	I/II
2009	F	7m	A	No	23.1	20.2	2.3	21.7	15.2	2.2	TcV	NP	I/II
2011	M	38y	A	No	24.6	10.5	2.0	23.9	2.6	1.4	TcII/V/VI	TcV + II	I/II
2010	F	32y	A	No	25.7	3.3	1.5	27.2	NQ	–	TcII/V/VI	–	I/II
2011	M	29y	A	No	26.0	4.1	1.6	24.3	2.0	1.3	–	–	I/II
2010	M	45y	A	No	26.7	2.0	1.3	25.1	1.2	1.1	–	TcII/V/VI	I/II
2010*	M	10y	A	No	27.2	1.5	1.2	23.5	3.8	1.6	–	TcV	I/II
2011	M	36y	A	No	27.6	NQ	–	31.4	NQ	–	–	–	I/II
2010	M	37y	C	No	28.1	NQ	–	29.5	NQ	–	–	–	I/II
2011	M	43y	A	No	28.2	NQ	–	22.9	5.8	1.8	–	TcV	I/II
2010	F	34y	A	Yes	28.3	NQ	–	25.1	1.2	1.1	–	–	I/II
2012	F	26y	A	No	29.2	NQ	–	28.1	NQ	–	–	–	I/II
2009	F	39y	D	Yes	29.6	NQ	–	28.5	NQ	–	–	–	I/II
2014	F	45y	A	No	30.2	NQ	–	28.0	NQ	–	–	–	I/II
2009	F	30y	D	Yes	30.5	NQ	–	28.5	NQ	–	–	–	I
2012	F	30y	D	Yes	30.5	NQ	–	30.3	NQ	–	–	–	I/II
2010	M	Adult**	A	No	33.0	NQ	–	29.6	NQ	–	–	TcII/V/VI	I/II
2014	M	13y	A	No	35.2	NQ	–	35.7	NQ	–	–	–	I/II

M, male; F, female; d, days; m, months; y, years; A, asymptomatic; C, cardiac; D, digestive; NP, not performed; NQ, non-quantifiable; Ct, cycle threshold; Par. eq./mL, parasite equivalents in 1 mL of blood; Log₁₀ par. eq./10 mL, logarithmic values of parasite equivalents in 10 mL of blood; qPCR, quantitative polymerase chain reaction; SatDNA, satellite DNA; kDNA, kinetoplastid DNA; DTU, discrete typing unit; MTq-PCR, multiplex real-time PCR using TaqMan probes flowchart; Conv. PCR, conventional PCR flowchart.

* Siblings.

** Age unknown.

^a Treatment with Benznidazole finished.

^b Limit of quantification (LOQ) for SatDNA qPCR: 1.53 par. eq./mL [15].

^c LOQ for kDNA qPCR: 0.9 par. eq./mL [19].

In the peripheral blood of patients TcV is described as predominant [21,36,37]. The absence or low presence of other *T. cruzi* genotypes in this sample may be due to their location in tissues and a low parasitic load in circulating blood [21,38–40]. It has been shown that *T. cruzi* I patients from the southern cone usually present low parasitemias, respect to patients infected by TcV [21]. Studies of cardiac explants of Argentinian patients have also demonstrated that TcI can also cause cardiopathies in the Southern Cone of Latin America [21], where this kind of disorder is known to be produced by TcII, TcV and TcVI [30]. Indeed, TcI was more common in cardiac explants than TcV, which was mainly detectable in culture isolates from peripheral blood [36]. This tropism of *T. cruzi* genotypes could partly explain the TcV findings and absence or minority presence of TcI in our samples.

On the other hand, TcI has been detected in the bloodstream of patients from the Southern Cone under conditions of immunosuppression, due to organ transplantation or human immunodeficiency virus (HIV) co-infection [21,41,42]. It has therefore been proposed that in conditions of immunocompetence, these TcI strains may display low parasitic loads, which impedes their detection in peripheral blood [21]. In fact, patient parasite populations characterized as TcII/V/VI showed a mean parasitic load of 0.8 or 0.4 log₁₀ par. eq./10 mL by Sat-DNA qPCR or kDNA qPCR, respectively; *T. cruzi* populations characterized as TcV gave a mean value of 2.1 log₁₀ par. eq./10 mL using SatDNA qPCR and 2.3 log₁₀ par. eq./10 mL by kDNA qPCR; finally, populations characterized as mixed infections of TcV plus TcII and TcV plus TcII/VI showed a mean parasitic load of 2.8 log₁₀ par. eq./10 mL using both SatDNA and kDNA qPCR methods (see Table 1).

Five out of six neonates and pediatric samples could be characterized, four of them corresponding to children under 10 months old and with the highest parasitic load (Table 1). Congenitally infected neonates frequently harbor a high parasitic burden [43], which facilitates DTU typing compared to the low parasitemia frequent in chronic Chagas disease adults [16,44]. However, in some instances, there are newborns with lower parasitemia and it seems to be related to several factors: the amount of parasites transmitted from the mother, the virulence of

the parasite strains, the stage of gestation when occurs the transplacental transmission of the parasite and the fetal capacity to control the infection [44–46]. Actually, congenital infection of *T. cruzi* results from the interaction between parasites, pregnant women, placenta and fetuses as reported Carlier and Truyens [46]. More recently, Juiz et al. [47] confirmed the placenta as a key organ for the parasite transmission by describing the association of human polymorphisms in placentally expressed genes with the susceptibility to congenital *T. cruzi* infection. Four out of the five samples were identified as TcV, in agreement with the results obtained in previous studies [43,44,48], and the fifth was a mixed infection of TcV plus TcII/VI. Other authors have reported that mixed infections are frequent in newborns and younger patients with early infection in Bolivia and Chile [33,49].

Congenital Chagas disease is the main responsible for autochthonous *T. cruzi* infection in non-endemic countries [46]. Several studies showed that there is a clear correlation between the *T. cruzi* lineages found in the mother and in the congenitally infected newborn and they are also similar to those detected in the local population [20,46, 48,50,51]. However, differences between the DTUs affecting the mother and the infant can be also observed in case of mixed infections [46]. Higher parasitemia in pregnant women without vector-borne exposure is suspected and it favors vertical transmission [52]. Thus, it can be expected that TcV could be the prevailing DTU of autochthonous cases in the Barcelona area if infected women of reproductive age are not treated [53,54] although congenital cases caused by TcII and TcVI could not be ruled out.

Limiting factors for DTU identification flowcharts of the study, together with the parasitic load, are the low number of tested samples and the fact that only peripheral blood samples were analyzed, since it was not reasonable to obtain cardiac and/or digestive tissue biopsies in this group of patients. Another possible explanation for the negative results of some samples could be the quality of the extracted DNA due to the long-term storage panel. Nevertheless, the results reported in this study did not show a relationship between the storage time of DNA samples and successful DTU identification. Samples were collected

from patients during the period October 2009 to February 2014 and the collection dates of the 10 samples with positive results in the DTU identification flowcharts ranged from November 2009 to January 2013. Actually, all samples were detectable for RNase P human gene with a Ct values ranged from 20.4 to 24.4, which indicates a good quality of the DNA regardless of whether they could be genotyped or not.

The MTq-PCR flowchart has multiple advantages: reduction of carry-over contamination, amenability to quantification and automation for kit production, fast determination and easy interpretation of results [16]. On the other hand, the conventional PCR flowchart requires multiple sequential reactions but it allowed us to identify parasite genotypes in specimens with lower parasitic loads than the MTq-PCR flowchart. Both methods are useful to determine *T. cruzi* DTUs in cultured stocks and also in samples of patients with acute or congenital infection but their sensitivity decreases when they are used in blood samples from patients in the chronic stage of the disease.

The molecular characterization of *T. cruzi* based on the SatDNA has the benefit that it can be applied with low parasitic loads. Indeed, SatDNA is a widely used parasitic target for the molecular diagnosis of *T. cruzi* infection and its good performance has been proved [55]. Although the method has the limitation that it cannot classify *T. cruzi* populations at the level of a single DTU, it enables us to increase the number of characterized cases when compared to the flowcharts, at least in the form of SatDNA type I, II and I/II hybrid. Further studies in this field are needed.

4. Conclusions

The most identified DTU was TcV, one of the most common genotypes in Bolivia and predominant in peripheral blood samples. A mixed infection by TcV plus TcII was detected for the first time simultaneously in Bolivian migrants. The 95% of the samples analyzed showed SatDNA type I/II hybrid sequences and only a sample had SatDNA type I sequence, probably belonging to a TcI population.

Identification flowcharts are very useful to characterize DTUs in *T. cruzi* natural populations during acute infection but not sensitive enough for analysis of patients with low parasitic loads. SatDNA sequence analysis cannot discriminate *T. cruzi* populations at the level of a single DTU but it enabled us to increase the number of characterized cases in chronically infected patients.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2016.12.003>.

Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was partially funded by Departament d'Universitats, Recerca i Societat de la Informació de la Generalitat de Catalunya (2014SGR026) and Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB Sant Pau). The work was also supported by Plan Nacional de I + D + i and Instituto de Salud Carlos III, Subdirección General de Redes y Centros de Investigación Cooperativa, Ministerio de Economía y Competitividad, Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI RD12/0015) - co-financed by European Development Regional Fund "A way to achieve Europe" ERDF. The authors would like to thank Dr. M. Ester Serra Aranda from Coordinació logística de Consultes Externes de l'Hospital Clínic i Provincial for her contribution, Dr. Pere Coll for his useful scientific discussions and the anonymous reviewers for their helpful suggestions and comments. AA, MG, ST, AF, MJP, LT, EP, CB and JG belong to the RICET, a Tropical Disease Cooperative Research Network in Spain (grant number RD12/0018/0010). JG, MG, AGS and MJP are members of NHEPACHA network "Nuevas Herramientas para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas".

References

- [1] World Health Organization, Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, *Wkly Epidemiol. Rec.* 90 (6) (2015) 33–44.
- [2] F. Guhl, C. Jaramillo, G.A. Vallejo, R. Yockteng, F. Cárdenas-Arroyo, G. Fornaciari, B. Arriaza, A.C. Aufderheide, Isolation of *Trypanosoma cruzi* DNA in 4,000-year-old mummified human tissue from northern Chile, *Am. J. Phys. Anthropol.* 108 (1999) 401–407.
- [3] J. Gascón, C. Bern, M.J. Pinazo, Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries, *Acta Trop.* 115 (2010) 22–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>.
- [4] M.J. Pinazo, J. Gascón, The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health), *Acta Trop.* 151 (2015) 16–20, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.06.013>.
- [5] G.A. Schmunis, Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 (Suppl. I) (2007) 75–85.
- [6] C. Roca, M.J. Pinazo, P. López-Chejade, J. Bayó, E. Posada, J. López-Solana, M. Gállego, M. Portús, J. Gascón, Chagas-Clot Research Group, Chagas disease among the Latin American adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e1135, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001135>.
- [7] A. Prata, Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, *Lancet Infect. Dis.* 1 (2001) 92–100, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2).
- [8] A. Rassi Jr., A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet* 375 (2010) 1388–1402, [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- [9] A. Rassi Jr., A. Rassi, J. Marcondes de Rezende, American trypanosomiasis (Chagas disease), *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 26 (2012) 275–291, <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- [10] B. Zingales, S.G. Andrade, M.R.S. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Sturm, M. Tibayrenc, A.G. Schijman, A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intra-specific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (2009) 1051–1054, <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.
- [11] B. Zingales, M.A. Miles, D.A. Campbell, M. Tibayrenc, A.M. Macedo, M.M.G. Teixeira, A.G. Schijman, M.S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C.R. Machado, S.G. Andrade, N.R. Sturm, The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infect. Genet. Evol.* 12 (2012) 240–253, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.
- [12] M. Tibayrenc, Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach, *Int. J. Parasitol.* 28 (1998) 85–104, [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(97\)00180-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(97)00180-X).
- [13] M.A. Miles, M.S. Llewellyn, M.D. Lewis, M. Yeo, R. Baleela, S. Fitzpatrick, M.W. Gaunt, I.L. Mauricio, The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future, *Parasitology* 136 (2009) 1509–1528, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182009990977>.
- [14] J.D. Ramírez, F. Guhl, L.M. Rendón, F. Rosas, J.A. Marin-Neto, C.A. Morillo, Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) e899, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000899>.
- [15] T. Duffy, C.I. Cura, J.C. Ramírez, T. Abate, N.M. Cayo, R. Parrado, Z.D. Bello, E. Velazquez, A. Muñoz-Calderson, N.A. Juiz, J. Basile, L. Garcia, A. Riarte, J.R. Nasser, S.B. Ocampo, Z.E. Yadon, F. Torrico, B.A. de Noya, I. Ribeiro, A.G. Schijman, 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.* 7 (2013) e2000, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000>.
- [16] C.I. Cura, T. Duffy, R.H. Lucero, M. Bisio, J. Péneau, M. Jimenez-Coello, E. Calabuig, M.J. Gimenez, E. Valencia Ayala, S.A. Kjos, J. Santalla, S.M. Mahaney, N.M. Cayo, C. Nagel, L. Barcán, E.S. Málaga Machaca, K.Y. Acosta Viana, L. Brutus, S.B. Ocampo, C. Aznar, C.A. Cuba Cuba, R.E. Gürtler, J.M. Ramsey, I. Ribeiro, J.L. VandeBerg, Z.E. Yadon, A. Osuna, A.G. Schijman, Multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for the identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in biological and clinical samples, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) e0003765, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003765>.
- [17] M. Pirón, R. Fisa, N. Casamitjana, P. López-Chejade, L. Puig, M. Vergés, J. Gascón, J. Gómez i Prat, M. Portús, S. Sauleada, Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples, *Acta Trop.* 103 (2007) 195–200, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019>.
- [18] Y. Qvarnstrom, A.G. Schijman, V. Veron, C. Aznar, F. Steurer, A.J. da Silva, Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) 1–8, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001689>.
- [19] J.C. Ramírez, C.I. Cura, O. da Cruz Moreira, E. Lages-Silva, N. Juiz, E. Velázquez, J.D. Ramírez, A. Alberti, P. Pavia, M.D. Flores-Chávez, A. Muñoz-Calderón, D. Pérez-Morales, J. Santalla, P.M. da Matta Guedes, J. Péneau, P. Marcet, C. Padilla, D. Cruz-Robles, E. Valencia, G.E. Crisante, G. Greif, I. Zulantay, J.A. Costales, M. Alvarez-Martínez, N.E. Martínez, R. Villarreal, S. Villarreal, Z. Sánchez, M. Bisio, R. Parrado, M.L. da Cunha Galvão, A.C. Jácome da Câmara, B. Espinoza, B. Alarcón de Noya, C. Puerta, A. Riarte, P. Diosque, S. Sosa-Estani, F. Guhl, I. Ribeiro, C. Aznar, C. Britto, Z.E. Yadón, A.G. Schijman, Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients, *J. Mol. Diagn.* 17 (2015) 605–615, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>.
- [20] J.M. Burgos, J. Altcheh, M. Bisio, T. Duffy, H.M.S. Valadares, M.E. Seidenstein, R. Piccinalli, J.M. Freitas, M.J. Levin, L. Macchi, A.M. Macedo, H. Freilij, A.G. Schijman, Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi*

- bloodstream populations causing congenital Chagas disease, *Int. J. Parasitol.* 37 (2007) 1319–1327, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.015>.
- [21] J.M. Burgos, M. Diez, C. Vigliano, M. Bisio, M. Riso, T. Duffy, C. Cura, B. Bruses, L. Favaloro, M.S. Leguizamón, R.H. Lucero, R. Laguens, M.J. Levin, R. Favaloro, A.G. Schijman, Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation, *Clin. Infect. Dis.* 51 (2010) 485–495, <http://dx.doi.org/10.1086/655680>.
- [22] M.C.Q.B. Elias, N. Vargas, L. Tomazi, A. Pedroso, B. Zingales, S. Schenkman, M.R.S. Briones, 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.* 140 (2005) 221–227, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2004.12.016>.
- [23] S. lenne, A. Pedroso, R. Carmona e Ferreira, M.R.S. Briones, B. Zingales, Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern, *Infect. Genet. Evol.* 10 (2010) 601–606, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.04.007>.
- [24] J.A. Pérez-Molina, C. Poveda, A. Martínez-Pérez, F. Guhl, B. Monge-Maillo, M. Fresno, R. López-Vélez, J.D. Ramírez, N. Girones, Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain, *Infect. Genet. Evol.* 21 (2014) 440–442, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.018>.
- [25] A. Martínez-Pérez, C. Poveda, J.D. Ramírez, F. Norman, N. Gironés, F. Guhl, B. Monge-Maillo, M. Fresno, R. López-Vélez, Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain, *Acta Trop.* 157 (2016) 145–150, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.01.032>.
- [26] J. Muñoz, J. Gómez i Prat, M. Gállego, F. Gimenó, B. Treviño, P. López-Chejade, O. Ribera, L. Molina, S. Sanz, M.J. Pinazo, C. Riera, E.J. Posada, G. Sanz, M. Portús, J. Gascón, Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain), *Acta Trop.* 111 (2009) 51–55, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.005>.
- [27] T. Duffy, M. Bisio, J. Altcheh, J.M. Burgos, M. Diez, M.J. Levin, R.R. Favaloro, H. Freilij, A.G. Schijman, Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e419, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000419>.
- [28] M.C.Q.B. Elias, N.S. Vargas, B. Zingales, S. Schenkman, Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 129 (2003) 1–9, [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(03\)00054-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(03)00054-9).
- [29] M.S. Llewellyn, M.A. Miles, H.J. Carrasco, M.D. Lewis, M. Yeo, J. Vargas, F. Torrico, P. Diosque, V. Valente, S.A. Valente, M.W. Gaunt, Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000410, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000410>.
- [30] F. Guhl, J.D. Ramírez, *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop.* 119 (2011) 1–4, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.04.002>.
- [31] H.J. Carrasco, M. Segovia, M.S. Llewellyn, A. Morocoima, S. Urdaneta-Morales, C. Martínez, C.E. Martínez, C. García, M. Rodríguez, R. Espinosa, B.A. de Noya, Z. Díaz-Bello, L. Herrera, S. Fitzpatrick, M. Yeo, M.A. Miles, M.D. Feliciangeli, Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1707, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001707>.
- [32] P. Diosque, N. Tomasini, J.J. Lauthier, L.A. Messenger, M.M. Monje Rumi, P.G. Ragone, A.M. Alberti-D'Amato, C. Pérez Brandán, C. Barnabé, M. Tibayrenc, M.D. Lewis, M.S. Llewellyn, M.A. Miles, M. Yeo, Optimized Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e3117, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003117>.
- [33] S.F. Brenière, C. Aliaga, E. Waleckx, R. Buitrago, R. Salas, C. Barnabé, M. Tibayrenc, F. Noireau, Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: predominance of TcI, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) e1650, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0001650>.
- [34] A.M. Macedo, S.D.J. Pena, Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease, *Parasitol. Today* 14 (1998) 119–124.
- [35] C.J. Perez, A.J. Lymbery, R.C.A. Thompson, Chagas disease: the challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol.* 30 (2014) 176–182, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2014.01.008>.
- [36] C.I. Cura, R.H. Lucero, M. Bisio, E. Oshiro, L.B. Formichelli, J.M. Burgos, S. Lejona, B.L. Bruses, D.O. Hernandez, G.V. Severini, E. Velazquez, T. Duffy, E. Anchart, R. Lattes, J. Altcheh, H. Freilij, M. Diez, C. Nagel, C. Vigliano, L. Favaloro, R.R. Favaloro, D.E. Merino, S. Sosa-Estani, A.G. Schijman, *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina, *Parasitology* 139 (2012) 516–521, <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182011002186>.
- [37] M.D.P. Fernández, M.C. Cecere, L.A. Lanati, M.A. Lauricella, A.G. Schijman, R.E. Gürtler, M.V. Cardinal, Geographic variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units from *Triatoma infestans* at different spatial scales, *Acta Trop.* 140 (2014) 10–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.07.014>.
- [38] A.C.J. Câmara, A.A. Varela-Freire, H.M.S. Valadares, A.M. Macedo, D.A. D'Ávila, C.R. Machado, E. Lages-Silva, E. Chiari, L.M.C. Galvão, Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil, *Acta Trop.* 115 (2010) 205–211, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.003>.
- [39] D.A. D'Ávila, A.M. Macedo, H.M.S. Valadares, E.D. Gontijo, A.M. de Castro, C.R. Machado, E. Chiari, L.M.C. Galvão, Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients, *J. Clin. Microbiol.* 47 (2009) 1718–1725, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01658-08>.
- [40] A.R. Vago, L.O. Andrade, A.A. Leite, D. d'Ávila Reis, A.M. Macedo, S.J. Adad, S. Tostes Jr., M.C. Moreira, G.B. Filho, S.D. Pena, 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.* 156 (2000) 1805–1809, [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65052-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65052-3).
- [41] M. Bisio, C. Cura, T. Duffy, J. Altcheh, S.O. Giganti, S. Begher, P.G. Scapellato, J.M. Burgos, M.J. Levin, R. Schreck, H. Freilij, A.G. Schijman, *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients with HIV co-infection, *Rev. Biomed.* 20 (2009) 166–178.
- [42] J.M. Burgos, S. Begher, H.M. Valadares Silva, M. Bisio, T. Duffy, M.J. Levin, A.M. Macedo, A.G. Schijman, Case report: molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS, *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 78 (2008) 294–297.
- [43] J. Bua, B.J. Volta, A.E. Perrone, K. Scollo, E.B. Velázquez, A.M. Ruiz, A.M. De Rissio, R.L. Cardoni, How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2476, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002476>.
- [44] M. Virreira, C. Truyens, C. Alonso-Vega, L. Brutus, J. Jijena, F. Torrico, Y. Carlier, M. Svoboda, Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns, *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 77 (2007) 102–106.
- [45] I. Zulantay, G. Corral, M.C. Guzman, F. Aldunate, W. Guerra, I. Cruz, A. Araya, V. Tapia, F. Marquez, C. Muñoz, W. Apt, The investigation of congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: three protocols explored in a pilot project, *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 105 (2011) 123–128, <http://dx.doi.org/10.1179/13648591X12899838413583>.
- [46] Y. Carlier, C. Truyens, Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses, *Acta Trop.* 151 (2015) 103–115, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>.
- [47] N.A. Juiz, N.M. Cayo, M. Burgos, M.E. Salvo, J.R. Nasser, J. Búa, S.A. Longhi, A.G. Schijman, Human polymorphisms in placentally expressed genes and their association with susceptibility to congenital *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Infect. Dis.* 213 (2016) 1299–1306, <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiv561>.
- [48] R.M. Corrales, M.C. Mora, O. Sanchez Negrette, P. Diosque, D. Lacunza, M. Virreira, S.F. Brenière, M.A. Basombrio, Congenital Chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage Ild in the northwestern province of Salta, Argentina, *Infect. Genet. Evol.* 9 (2009) 278–282, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2008.12.008>.
- [49] A. Garcia, S. Ortiz, C. Iribarren, M.I. Bahamonde, A. Solari, Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages, *Parasitol. Int.* 63 (2014) 138–139, <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.10.010>.
- [50] S. Ortiz, I. Zulantay, A. Solari, M. Bisio, A.G. Schijman, Y. Carlier, W. Apt, Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases, *Acta Trop.* 124 (2012) 243–246, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.001>.
- [51] M. Virreira, C. Alonso-Vega, M. Solano, J. Jijena, L. Brutus, Z. Bustamante, C. Truyens, D. Schneider, F. Torrico, Y. Carlier, M. Svoboda, Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*, *Am.J.Trop. Med. Hyg.* 75 (2006) 871–879.
- [52] V.R. Rendell, R.H. Gilman, E. Valencia, G. Galdos-Cardenas, M. Verastegui, L. Sanchez, J. Acosta, G. Sanchez, L. Ferrufino, C. LaFuente, M.D.C. Abastoflor, R. Colanzi, C. Bern, *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk, *PLoS One* 10 (2015) e0119527, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0119527>.
- [53] D.L. Fabbro, E. Danesi, V. Olivera, M.O. Codebó, S. Denner, C. Heredia, M. Streiger, S. Sosa-Estani, Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) e3312, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003312>.
- [54] S. Sosa-Estani, E. Cura, E. Velazquez, C. Yamptotis, E.L. Segura, Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42 (2009) 484–487.
- [55] A.G. Schijman, M. Bisio, L. Orellana, M. Sued, T. Duffy, A.M. Mejia Jaramillo, C. Cura, F. Auer, V. Veron, Y. Qvarnstrom, S. Deborggraeve, G. Hajar, I. Zulantay, R.H. Lucero, E. Velazquez, T. Tellez, Z. Sanchez Leon, L. Galvao, D. Nolder, M. Monje Rumi, J.E. Levi, J.D. Ramirez, P. Zorrilla, M. Flores, M.I. Jercic, G. Crisante, N. Añez, A.M. De Castro, C.I. Gonzalez, K. Acosta Viana, P. Yachelini, F. Torrico, C. Robello, P. Diosque, O. Triana Chavez, C. Aznar, G. Russomando, P. Büscher, A. Assal, F. Guhl, S. Sosa Estani, A. DaSilva, C. Britto, A. Luquetti, J. Ladzins, International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e931, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>.
- [56] S. Brisse, J. Verhoef, M. Tibayrenc, Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages, *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 1218–1226, [http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00238-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00238-7).
- [57] R.H. Lucero, B.L. Brusés, C.I. Cura, L.B. Formichelli, N. Juiz, G.J. Fernández, M. Bisio, G.D. Deluca, S. Besuschio, D.O. Hernández, A.G. Schijman, Chagas disease' in Aborigin and Creole communities from the Gran Chaco Region of Argentina: seroprevalence and molecular parasitological characterization, *Infect. Genet. Evol.* 41 (2016) 84–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.03.028>.

IV. DISCUSIÓN

IV. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas se ha convertido, a pesar de la ausencia del vector, en un problema emergente y de salud pública en Estados Unidos y Europa debido a los flujos migratorios procedentes de zonas endémicas de América Latina (Bonney, 2014; Gascón y col., 2010; Schmunis, 2007).

Según Albajar-Viñas y Jannin (2011), la historia de la enfermedad de Chagas en Europa se puede dividir en tres períodos. El primer período se inicia con el primer caso de Chagas en Europa el 1981 (Pehrson y col., 1981). A partir de ese momento aparecieron publicaciones esporádicas de nuevos casos en diferentes países europeos. El segundo período comienza en el año 2000 con el incremento significativo del número de casos publicados coincidiendo con un aumento de la migración entre América Latina y Europa. Finalmente, el último período tiene lugar a partir de 2007 con la aparición de diversas iniciativas promovidas por la OMS y la OPS para hacer frente a la infección por *T. cruzi* en zonas no endémicas. Estas acciones condujeron a la inclusión, por primera vez, de la enfermedad de Chagas como una de las 17 NTD según la OMS (WHO, 2010; 2013).

El perfil de la población migrante procedente de América Latina es joven y con un porcentaje muy elevado de mujeres (Albajar-Viñas y Jannin, 2011). Sin embargo, la gran cantidad de migrantes indocumentados favorece el elevado índice de subdiagnóstico de la enfermedad de Chagas (Strasen y col., 2014) y dificulta la obtención y el estudio de los datos reales sobre la infección por *T. cruzi* (Basile y col., 2011a).

La situación actual requiere acciones inmediatas, como programas de cribado, para conseguir un diagnóstico precoz y evitar la transmisión de la enfermedad. Un buen control de la infección por *T. cruzi* requiere de las técnicas diagnósticas adecuadas. El punto más crítico es establecer un consenso sobre el perfil del producto que tenemos como objetivo (TPP, del inglés “Target Product Profile”) para el desarrollo de las herramientas necesarias para hacer frente a la enfermedad. Porrás y col. (2015) propusieron un consenso de TPP para la infección por *T. cruzi* en tres escenarios diferentes: (i) diagnóstico de la infección aguda, (ii) diagnóstico de los pacientes en fase crónica y (iii) valoración de la respuesta al tratamiento antiparasitario en pacientes

crónicos. Este acuerdo sobre las prioridades diagnósticas permite garantizar que los esfuerzos y recursos se dirijan al desarrollo de técnicas adecuadas que contribuyan al buen control de la enfermedad aunque los TPPs actuales deben ser revisados y ampliados con el fin de cumplir con todas las necesidades (Picado y col., 2017).

1. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En los países no endémicos, como es el caso de España, hay presencia de casos crónicos de la enfermedad de Chagas, debido a la población migrante que se infecta en su país de origen (Bern y Montgomery, 2009; Muñoz y col., 2009b), así como también de casos agudos a causa de la transmisión vertical (Muñoz y col., 2009a).

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica requiere al menos la realización de dos técnicas serológicas para su confirmación (WHO, 2002) mientras que, en el caso de la infección congénita, las técnicas serológicas deben realizarse a partir de los nueve meses de edad para evitar la presencia de anticuerpos IgG maternos (Carlier y col., 2011). Además, el estudio de la cinética de estas IgG puede resultar clave en el diagnóstico de los casos congénitos (Flores-Chávez y col., 2007) así como la implementación de los métodos parasitológicos y la PCR pueden ser de gran utilidad durante las primeras semanas de vida (Bern y col., 2009; 2011b; Burgos y col., 2009 Schijman y col., 2003). No obstante, los métodos de diagnóstico directo no siempre permiten realizar un diagnóstico precoz de la infección y se debe recurrir a la serología.

Según la OMS (WHO, 2002), una prueba serológica ideal debe ser fácil de realizar en un solo paso, ser rápida, barata, no requerir equipo especial o refrigeración de los reactivos y tener una sensibilidad y especificidad del 100%. Desafortunadamente, no existe tal prueba para la enfermedad de Chagas. La gran cantidad de tests serológicos disponibles actualmente en el mercado, algunos de ellos sin valoración previa, así como los resultados discrepantes dificultan el diagnóstico indirecto y la interpretación de los resultados (Guzmán-Gómez y col., 2015; Lapa y col., 2012; Reithinger y col., 2009). Además, la falta de una técnica de referencia hace imposible determinar el verdadero impacto de la enfermedad (Reithinger y col., 2009).

Recientemente, se han desarrollado tests serológicos de nueva generación con un gran potencial diagnóstico. El incremento de los antígenos utilizados y la incorporación de diferentes sistemas de detección, como la quimioluminiscencia, incrementan la

sensibilidad y la especificidad de las técnicas. Otras ventajas de estos nuevos tests son el automatismo, la velocidad y el elevado rendimiento. Entre ellos encontramos a Architect Chagas, un ensayo CMIA que utiliza cuatro proteínas recombinantes que en conjunto representan 14 regiones antigénicas presentes durante todo el ciclo biológico de *T. cruzi* (Chang y col., 2006; Cheng y col., 2007; da Silveira y col., 2001) y que había estado poco evaluado hasta el momento (Holguín y col., 2013; Iborra-Bendicho y col., 2012; Praast y col., 2011). De ahí el interés de evaluar la utilidad de este método en la infección por *T. cruzi*.

El primer trabajo **“Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change?”** se centró en valorar la utilidad diagnóstica del CMIA Architect Chagas en pacientes crónicos. El ensayo obtuvo un 100% de sensibilidad y un 97,6% de especificidad y prácticamente todos los resultados Falsos Positivos (FP) fueron consecuencia de reacciones cruzadas con *Leishmania*, un problema bien conocido en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Berrizbeitia y col., 2006; Flores-Chávez y col., 2007). De hecho, la especificidad del test aumentó hasta el 99,5% al excluir los sueros de los pacientes con leishmaniasis visceral. Las medidas de valor diagnóstico de Architect Chagas fueron superiores a las de los otros ensayos utilizados, un ELISA *in house* con antígeno total del parásito (ELISAc) (Riera y col., 2009) y el BioELISA recombinante (ELISAr) de la casa comercial Biokit (Lliçà d’Amunt, España).

Probablemente, la gran sensibilidad de la técnica se debe a la diversidad de proteínas utilizadas como antígeno, representando las tres formas morfológicas (tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes) y a la diversidad genética del parásito (da Silveira y col., 2001; Praast y col., 2011). Las mezclas de proteínas recombinantes son de gran utilidad para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (Umezawa y col., 2003; 2004) y el sistema de detección basado en la quimioluminiscencia aumenta la amplificación de la luz y la duración de la señal en comparación con los ensayos ELISA convencionales. Este hecho también podría explicar el elevado número de reacciones cruzadas con *Leishmania* (cinco de los seis casos detectados) y debe tenerse en cuenta cuando se realizan estudios en zonas endémicas de leishmaniasis visceral.

En este estudio constatamos que todos los resultados FP presentaban valores inferiores a 6 S/CO, por lo que se propuso utilizar el Architect Chagas como única técnica diagnóstica cuando los resultados obtenidos eran superiores a este valor. Ello representa

que en nuestro estudio se tendría que utilizar una segunda técnica confirmatoria en tan solo el 6,3% de las muestras analizadas.

Después de abordar el diagnóstico serológico en la fase crónica de la enfermedad de Chagas, nos pareció interesante estudiar la situación en el caso de la infección congénita. La vía vertical se considera la principal ruta de transmisión de la enfermedad de Chagas en países no endémicos debido a la elevada proporción de mujeres migrantes latinoamericanas en edad fértil residentes en estas zonas (Buekens y col., 2008; Gascón y Pinazo, 2008; González-Torné y col., 2013; Jackson y col., 2014b; Oliveira y col., 2010). El cribado y tratamiento de estas mujeres es crucial para evitar la transmisión a sus hijos y perpetuar la enfermedad (Fabbro y col., 2014; Moscatelli y col., 2015; Sicuri y col., 2011).

El segundo trabajo **“Towards a new strategy for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection”** se basó en evaluar la utilidad de diferentes técnicas serológicas en el diagnóstico y seguimiento de la infección congénita por *T. cruzi*. Las técnicas escogidas fueron la IFI de la casa comercial Trinity Biotech (Bray Country, Wicklow, Irlanda), los dos ELISAs utilizados en el trabajo de valoración del diagnóstico en adultos (ELISAc y ELISAr), el CMIA Architect Chagas y un WB *in house* con antígeno total de epimastigotes de *T. cruzi* (Riera y col., 2012). Estas técnicas serológicas fueron elegidas debido a su utilización en los laboratorios de rutina, incluido el nuestro (Muñoz y col., 2009a; b; Pérez-Ayala y col., 2011; Riera y col., 2009; Roca y col., 2011), y el WB por ser una técnica de gran utilidad para la confirmación de la infección por *T. cruzi* (Riera y col., 2012). También se realizó una qPCR con diana en el ADNsat del parásito (Pirón y col., 2007). Los niños fueron considerados positivos cuando se obtuvo un resultado positivo de qPCR o bien cuando el nivel de anticuerpos IgG se mantuvo durante el primer año de vida.

En los niños con infección congénita, se observó seropositividad por todas las técnicas y la cinética de anticuerpos sólo tendía a reducirse después del tratamiento. En los niños no infectados, a diferencia de los casos congénitos, se observó una clara tendencia a la negativización en comparación con los títulos basales de anticuerpos al nacer. Sin embargo, todos los métodos mostraron algún resultado positivo o en la zona gris pasados los nueve meses de edad aunque CMIA fue la única técnica que aún mantuvo un resultado en la zona gris pasados los 12 meses. Así pues, debido precisamente a la elevada sensibilidad de CMIA que lo convierte en un test óptimo para los pacientes

crónicos, consideramos que no es el método más adecuado para el diagnóstico de la infección congénita si se realiza una única determinación a los nueve meses. De acuerdo a nuestros resultados, CMIA puede detectar los anticuerpos IgG con más intensidad y durante más tiempo en la serología del recién nacido retrasando la negativización de los anticuerpos pasivos procedentes de la madre y, por tanto, impidiendo diagnosticar o descartar la infección de manera precoz.

En el caso del WB, no se pudo detectar ninguna banda específica para diferenciar los niños con y sin infección por *T. cruzi* y se observó un patrón de bandas muy homogéneo entre las madres y los niños en el momento del nacimiento. Mientras que en los niños no infectados se pudo detectar una disminución en el número de bandas y su intensidad durante el seguimiento, en los niños con infección congénita se observaron diferencias después de aproximadamente seis meses. Este hecho puede ser debido a que los anticuerpos maternos enmascaran la producción humoral en el recién nacido, haciéndose evidentes las diferencias en el patrón de bandas de madre e hijo cuando estos anticuerpos pasivos empiezan a ser escasos en el niño (López-Chejade y col., 2005). Así pues, el WB es un método de utilidad para diagnosticar la infección congénita por *T. cruzi* unos meses después del nacimiento en los laboratorios donde la técnica está disponible.

En referencia a la qPCR, los resultados fueron negativos en todos los niños no infectados y positivos en algún momento del seguimiento en los niños con infección congénita. En uno de los casos congénitos la qPCR fue negativa al nacer pero la infección fue confirmada a los 12 meses de edad mediante qPCR y serología mantenida. Así pues, una PCR positiva a partir del mes de edad confirma la infección pero un resultado negativo no la descarta. No obstante, la capacidad de la PCR para detectar cantidades muy pequeñas de ADN la convierte en una herramienta clave en el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* (Díez y col., 2008; Velázquez y col., 2014) pero es preciso realizar la prueba al mes de edad para evitar los FP por la posible transferencia de ADN materno (Carlier y col., 2015) y porque es el momento en el que la carga parasitaria está en su punto máximo (Bua y col., 2012; 2013).

2. PROTOCOLOS Y COSTO-EFECTIVIDAD

Hay evidencias de que en Europa la crisis financiera global y las medidas de austeridad han afectado significativamente a la gestión de la enfermedad de Chagas (Jackson y col., 2014b). Muchos inmigrantes se han trasladado a otros países de Europa o han regresado a sus países de origen debido a la falta de oportunidades derivadas de la crisis. Por tanto, hay una clara necesidad de un patrón de intervención común de los países europeos para controlar la enfermedad de Chagas (Jackson y col., 2014b). Aunque la infección por *T. cruzi* se ha convertido en un problema real para los países receptores de migrantes procedentes de países endémicos, no todos los países europeos tienen programas de vigilancia de la enfermedad y esta situación se puede haber agudizado debido a la reciente crisis económica (Pérez-Molina y col., 2015; Requena-Méndez y col., 2014).

Los protocolos actuales existentes no han sido consensuados e implican un coste adicional en el presupuesto sanitario. Por consiguiente, es muy importante establecer nuevas estrategias que permitan mejorar, agilizar y reducir los costes del diagnóstico de la enfermedad de Chagas tanto en la fase crónica como en el caso de la infección congénita.

En el primer trabajo **“Serological diagnosis of chronic Chagas disease: is it time for a change?”** proponemos como alternativa para el diagnóstico serológico de la infección crónica la aplicación de un método de alto rendimiento, el CMIA Architect Chagas en nuestro caso, como única técnica para discriminar los resultados negativos y la aplicación de una segunda técnica únicamente en las muestras en zona gris o positivas con valores ≤ 6 S/CO, lo que resultaría en un ahorro significativo en la gestión y el control de la enfermedad de Chagas. De hecho, calculamos que el ahorro total en un año en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona ascendería a 4.182 euros o 4.516,56 dólares en comparación con el coste de realizar dos ensayos para todos los sueros, estrategia recomendada por la OMS y utilizada hasta la fecha (WHO, 2002).

Los programas de cribado de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus hijos son muy poco comunes en las zonas no endémicas (Oliveira y col., 2010; Soriano-Arandes y col., 2016). La variedad de protocolos usados en los programas de control requiere el urgente establecimiento de una estrategia uniforme y común en todos los laboratorios que permita un diagnóstico rápido, eficiente y costo-efectivo para la infección congénita por *T. cruzi*.

Con el objetivo de mejorar el diagnóstico de la infección congénita, en el segundo trabajo “**Towards a new strategy for the diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection**” proponemos una estrategia costo-efectiva que reduce el número de tests a utilizar en comparación con los algoritmos utilizados en diferentes regiones europeas (La Toscana en Italia y las comunidades autónomas de Cataluña, Galicia y Valencia en España). El protocolo podría empezar directamente al mes de edad con un método parasitológico y/o una PCR. Si el diagnóstico directo es negativo, se realizaría una serología a los nueve meses de edad seguido de otra serología confirmatoria a los 12 meses si el resultado es positivo.

Los dos primeros artículos nos han permitido proponer algoritmos con el fin de mejorar el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en pacientes crónicos y en niños con infección congénita.

3. CARACTERIZACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN LA POBLACIÓN INMIGRANTE ESTUDIADA

La diversidad genética de *T. cruzi* también juega un papel clave en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Las diferentes UDTs del parásito podrían contribuir en los resultados discordantes en los diferentes tests serológicos (Guzmán-Gómez y col., 2015). Aunque las causas de las diferencias en la clínica de la enfermedad no están claras, la variabilidad genética de *T. cruzi* está relacionada con muchas de las propiedades biomédicas del parásito como el crecimiento en cultivo, patogenicidad en ratones, transmisibilidad por el vector y susceptibilidad a los fármacos (Telleria y col., 2010). La taxonomía de *T. cruzi* siempre ha sido complicada y además se ha visto obstaculizada por la falta de métodos moleculares de tipificación estandarizados y el uso de varias nomenclaturas alternativas (Messenger y col., 2015a): biodemas (Andrade, 1974), zimodemas (Miles y col., 1977; 1978), clonets (Tibayrenc y Ayala; 1988; Tibayrenc y col., 1986), esquizodemas (Morel y col., 1980) y UDTs (Tibayrenc, 1998; Zingales y col., 2009) entre otros. La nomenclatura actual más consensuada contempla las UDTs.

En el tercer trabajo “**Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain)**” nos centramos en la identificación de las UDTs de *T. cruzi* en una población de inmigrantes procedentes de

países endémicos por la enfermedad de Chagas, atendidos en diferentes hospitales de Barcelona, así como en valorar diferentes estrategias moleculares de tipificación para la caracterización de los genotipos del parásito. El criterio de inclusión de las muestras fue obtener un resultado positivo en dos qPCRs, una basada en el ADNsat nuclear (Pirón y col., 2007) y la otra en la región conservada del minicírculo del ADNk de *T. cruzi* (Qvarnstrom y col., 2012). Los métodos de tipificación elegidos fueron (i) un diagrama de flujo de qPCR multiplex con sondas TaqMan (MTq-PCR) (Cura y col., 2015) basado en los marcadores moleculares SL-IR, ADNr 18S, CO-II y ADNr 24sα; (ii) un diagrama de flujo de PCR convencional (Burgos y col., 2007; 2010) basado en SL-IR, ADNr 24sα y A10; y (iii) secuenciación del ADNsat de *T. cruzi*. Estos sistemas de tipificación fueron elegidos debido a que son los métodos utilizados en el LaBMECh (INGEBI-CONICET) de Buenos Aires (Argentina), dirigido por el Dr. Alejandro G Schijman, en donde se realizó una estancia internacional durante la realización de la presente tesis doctoral.

El diagrama de MTq-PCR tiene varias ventajas: reducción de la contaminación por arrastre, fácil cuantificación y automatización, obtención e interpretación rápida de los resultados (Cura y col., 2015). El presente estudio nos permitió caracterizar cinco de las 20 muestras, tres a nivel de una única UDT. El diagrama de PCR convencional si bien requiere múltiples reacciones secuenciales, por lo que es más laborioso, nos permitió identificar los genotipos del parásito en muestras con menor carga parasitaria que el diagrama de MTq-PCR, llegándose a caracterizar seis muestras, dos de ellas a nivel de una única UDT y dos infecciones mixtas. Con respecto a la caracterización basada en la secuenciación del ADNsat, no permite discriminar a las poblaciones de *T. cruzi* a nivel de una única UDT, pero en las sangres analizadas se pudieron llegar a caracterizar las 20 muestras analizadas, 16 de pacientes crónicos. De hecho, el ADNsat es una diana cuya eficacia ya había sido probada y que es ampliamente utilizada para el diagnóstico molecular de *T. cruzi* debido al elevado número de copias de la secuencia por parásito (Schijman y col., 2011).

Un factor limitante de los estudios de identificación de las UDTs de *T. cruzi* es el hecho de que la mayoría de ellos se realizan a partir de sangre periférica. Estas muestras son idóneas al ser fáciles de obtener pero los tripomastigotes de *T. cruzi* no tienen capacidad multiplicativa, lo que limita la probabilidad de detectar al parásito cuando la carga parasitaria es baja. En la fase crónica de la enfermedad, las formas multiplicativas del

parásito, los amastigotes, se encuentran presentes en los tejidos. Sin embargo, las biopsias son muestras de difícil acceso y su obtención es altamente invasiva (Pérez y col., 2014; Ramírez y col., 2009). Por este motivo sería un avance importante poder utilizar la misma diana diagnóstica, por ejemplo el ADNsat con alrededor de 10^5 copias por célula (Eliás y col., 2003; 2005), para hacer la posterior caracterización del parásito presente en la muestra biológica. Se requieren más estudios en este sentido.

La utilización de la sangre periférica también puede conllevar un sesgo en la identificación de las UDTs presentes en el paciente ya que los linajes de *T. cruzi* podrían estar circulando en baja carga parasitaria o bien podrían estar presentes en los tejidos (Burgos y col., 2010; Cámara y col., 2010; D'Ávila y col., 2009; Vago y col., 2000). La UDT más identificada en este estudio fue TcV que, además de ser predominante en sangre periférica (Burgos y col., 2010; Cura y col., 2012; Fernández y col., 2014) es uno de los genotipos más comunes en Bolivia (Brenière y col., 2012), de donde procedían todas las muestras que pasaron el criterio de inclusión en nuestro estudio. Como en otros estudios (Brenière y col., 2012; Macedo y Pena, 1998; Pérez y col., 2014), también pudimos detectar dos infecciones mixtas, TcV-TcII y TcV-TcII/VI, la primera de ellas detectada por primera vez de manera simultánea en migrantes bolivianos en España.

Las estrategias de tipificación aún pueden ser mejoradas para poder identificar la variedad dentro de las UDTs, como se ha demostrado en el caso de TcI (Cura y col., 2010; Falla y col., 2009; Guhl y Ramírez, 2011; Ramírez y col., 2012). La secuenciación parece ser la mejor opción para este tipo de estudios aunque se podrían identificar nuevos marcadores con bajo número de copias y con elevada capacidad de discriminación (Muñoz y col., 2013). De hecho, otros estudios ya han propuesto estrategias para identificar la variedad a nivel de sub-UDT basados en el análisis de microsatélites (Llewellyn y col., 2009; Oliveira y col., 1998) y en estudios MLST (Diosque y col., 2014; Messenger y col., 2012; Yeo y col., 2011).

V. CONCLUSIONS

V. CONCLUSIONS

A. Diagnosis of chronic Chagas disease in an adult population

1. Architect Chagas is a highly effective assay for the diagnosis of chronic Chagas disease, with 100% sensitivity, and allowing the correct diagnosis of the majority of samples when applied as a single technique.
2. Architect Chagas can be used as a single assay in blood banks and clinical laboratories for routine diagnosis. Only gray-zone and positive serum samples with a result of ≤ 6 S/CO would need to be confirmed by a second serological assay to avoid both FP sera and cross-reactions with *Leishmania* species.
3. The application of this proposal would result in important savings in the cost of Chagas disease diagnosis and therefore in the management and control of the disease.

B. Diagnosis and follow-up of congenital *T. cruzi* infection in neonates and pediatric cases

1. In non-infected newborns, a continuous decreasing trend of passive IgG antibodies was observed but none of the serological assays seroreverted in all the infants before 12 months. From 12 months onwards, all the serological tests achieved negative results in the totality of the samples analyzed, with the exception of the highly sensitive CMIA.
2. In infants with congenital *T. cruzi* infection, the antibody decline was only detected after the initiation of the treatment.
3. In order to improve the diagnosis of congenital *T. cruzi* infection, we propose a new more cost-effective strategy with a reduced number of tests. The protocol could start at 1 month of age with a parasitological test and/or a PCR. If negative, a serology would be carried out at 9 months, followed by a confirmatory serological testing at around 12 months of age in case of positive results.

C. Identification of *T. cruzi* DTUs in Latin American migrants in Barcelona

1. The most frequently identified DTU was TcV, one of the most common genotypes in Bolivia and predominant in peripheral blood samples.
2. A mixed infection by TcV plus TcII was detected simultaneously for the first time in Bolivian migrants.
3. 95% of the samples analyzed showed SatDNA type I/II hybrid sequences and only one sample had a SatDNA type I sequence, probably belonging to a TcI population.
4. Identification flowcharts are very useful for DTU characterization in *T. cruzi* natural populations during acute infection but not sensitive enough for the analysis of patients with low parasitic loads.
5. SatDNA sequence analysis cannot discriminate between *T. cruzi* populations at the level of a single DTU but it enabled us to increase the number of characterized cases in chronically infected patients.

VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abad-Franch F, Lima MM, Sarquis O, Gurgel-Gonçalves R, Sánchez-Martín M, Calzada J, Saldaña A, Monteiro FA, Palomeque FS, Santos WS, Angulo VM, Esteban L, Dias FBS, Diotaiuti L, Bar ME, Gottdenker NL.** On palms, bugs, and Chagas diseases in the Americas. *Acta Trop* 2015; 151:126-141.
- Abalo M, Adelantado M, Areal C, Castrillo A, Castro A, Cid J, Eiras A, Flores J, Cabrera J.** Tracing of one year of Chagas screening at the Centro de Transfusión de Galicia concerning a positive blood donor. *Vox Sanguinis* 2007; 93(Supl 1):140.
- Albajar-Viñas P, Jannin J.** The hidden Chagas disease burden in Europe. *Euro Surveill* 2011; 16:pii=19975.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello ZR, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Muñoz-Calderón A, Noya O.** Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015a; 110:377-386.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Noya González OO.** Capítulo 6. La enfermedad de Chagas transmitida por vía oral. En: Viotti RJ, Vigliano CA. *Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica*. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015b; p.69-79.
- Alarcón de Noya B, Noya González O.** An ecological overview on the factors that drives to *Trypanosoma cruzi* oral transmission. *Acta Trop* 2015; 151:94-102.
- Almeida IC.** Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies as reliable biomarkers for the follow-up of Chagas disease chemotherapy. *Rev Esp Salud Pública* 2014; 88(Supl):9-16.
- Almeida IC, Covas DT, Soussumi LM, Travassos LR.** A highly sensitive and specific chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of active *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 1997; 37:850-857.
- Almeida IC, Ferguson MA, Schenkman S, Travassos LR.** Lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease recognize novel O-linked oligosaccharides on mucin-like glycosyl-phosphatidylinositol-anchored glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1994; 304:793-802.
- Almeida IC, Krautz GM, Krettli AU, Travassos LR.** Glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*: a 74 kD antigen of trypomastigotes specifically reacts with lytic anti-alpha-galactosyl antibodies from patients with chronic Chagas disease. *J Clin Lab Anal* 1993; 7:307-316.
- Almeida IC, Milani SR, Gorin PA, Travassos LR.** Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Immunol* 1991; 146:2394-2400.

- Altchek J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H.** Adverse events after the use of Benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* 2011; 127:e212-e218.
- Andrade SG.** Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop* 1974; 3:65-121.
- Andrade SG, Magalhães JB.** Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* 1997; 30:27-35.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG.** Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77:796-799.
- Angehen A, Anselmi M, Gobbi F, Marocco S, Monteiro G, Buonfrate D, Tais S, Talamo M, Zavarise G, Strohmeier M, Bartalesi F, Mantella A, Di Tommaso M, Aiello KH, Veneruso G, Graziani G, Ferrari MM, Spreafico I, Bonifacio E, Gaiera G, Lanzafame M, Mascarello M, Cancrini G, Albajar-Viñas P, Bisoffi Z, Bartoloni A.** Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. *Euro Surveill* 2011; 16:pii=19969.
- Angehen A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, Gandini G, Aprili G.** Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 2015; 13:540-550.
- Apt W.** Centenario del descubrimiento de Carlos Chagas (1909-2009). *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 2009; 1:92-94.
- Apt W, Heitmann I, Jercic MI, Jofré L, Muñoz P, Noemí I, San Martín AM, Sapunar J, Torres M, Zulantay I.** Guías clínicas de la enfermedad de Chagas. Parte VI. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infect* 2008; 25:384-389.
- Araújo A, Jansen AM, Reinhard K, Ferreira LF.** Paleoparasitology of Chagas disease – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(Supl 1):9-16.
- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, Arriaza B, Renier C, Wittmers Jr LE, Fornaciari G, Allison M.** A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:2034-2039.
- Ávila 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; 48:211-222.
- Ávila Arzanegui O, Liendo Arenaza P, Martínez Indart L, Martínez Astorkiza T, Pocheville Guruceta MI, Egurbide Arberas MV.** Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y transmisión vertical en mujeres gestantes latinoamericanas en un área de salud de Vizcaya. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31:210-216.
- Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA.** Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv Parasitol* 2016; 96:in press.

- Barnabé C, Mobarec HI, Jurado MR, Cortez JA, Brenière SF.** Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infect Genet Evol* 2016; 39:176-186.
- Barona-Vilar C, Giménez-Martí MJ, Fraile T, González-Steinbauer C, Parada C, Gil-Brusola A, Bravo D, Gómez MD, Navarro D, Pérez-Tamarit A, Fernández-Silveira L, Fullana-Montoro A, Borrás R.** Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women and congenital transmission rate in non-endemic area: the experience of the Valencian Health Programme (Spain). *Epidemiol Infect* 2012; 140:1896-1903.
- Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S.** The trypanosomiasis. *Lancet* 2003; 362:1469-1480.
- Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, Seixas J, Van Gool T, Cañavate C, Flores-Chávez M, Jackson Y, Chiodini PL, Albajar-Viñas P, Working Group on Chagas disease.** Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill* 2011a; 16:pii=19968.
- Basile L, Oliveira I, Ciruela P, Plasencia A, Working Group for developing the Catalanian Screening Programme for congenital transmission of Chagas disease.** The current screening programme for congenital transmission of Chagas disease in Catalonia, Spain. *Euro Surveill* 2011b; 16:pii=19972.
- Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, Dodd RY, Fearon M, Castro E.** *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion* 2012; 52:1913-1921.
- Bermúdez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S.** Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop* 2016; 156:1-16.
- Bern C.** Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 2011; 364:2527-2534.
- Bern C.** Chagas' disease. *N Engl J Med* 2015; 373:456-466.
- Bern C.** Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis* 2012; 25:450-457.
- Bern C, Kjos S, Yabsley MJ, Montgomery SP.** *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. *Clin Microbiol Rev* 2011a; 24:655-681.
- Bern C, Martin DL, Gilman RH.** Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011b; 75:19-47.
- Bern C, Montgomery SP.** An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2009; 49:e52-e54.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi Jr A, Marin-Neto JA, Dantas RO, Maguire JH, Acquatella H, Morillo C, Kirchhoff LV, Gilman RH, Reyes PA, Salvatella R, Moore AC.** Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States. *JAMA* 2007; 298:2171-2181.

- Bern C, Verastegui M, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, Pacori J, Abastoflor MC, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH.** Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* 2009; 49:1667-1674.
- Berrizbeitia M.** Antígenos de excreción/secreción de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (TESA) como herramientas útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Saber* 2013; 25:346-357.
- Berrizbeitia M, Ndao M, Bubis J, Gottschalk M, Aché A, Lacouture S, Medina M, Ward BJ.** Purified excreted-secreted antigens from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes as tools for diagnosis of Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 2006; 44:291-296.
- Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar A, Curto MA, Cruz Mata I, Picado de Puig A, Puerta C, Ndung'u J, Schijman AG.** Evaluación de un kit para detección molecular de ADN de *Trypanosoma cruzi* basado en la amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP). *Rev Enf Emerg* 2016; 15:36-44.
- Bonney KM.** Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 2014; 21:11.
- 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; 10:337.
- Brenière SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, Tibayrenc M, Noireau F.** Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: predominance of TcI. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1650.
- Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C.** Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (DTUs): attempt at an inventory. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004792.
- Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M.** Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 2000; 30:35-44.
- 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; 31:1218-1226.
- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM.** A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88:171-172.
- Brumpt.** Le xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier a la trypanosomose de Chagas. *Bull Soc Pat Exot* 1914; 7:706-710.
- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL.** How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection:

- relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e2476.
- Bua J, Volta BJ, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL.** Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2012; 106:623-628.
- Buekens P, Almendares O, Carlier Y, Dumonteil E, Eberhard M, Gamboa-León R, James M, Padilla N, Wesson D, Xiong X.** Mother-to-child transmission of Chagas' disease in North America: Why don't we do more? *Matern Child Health J* 2008; 12:283-286.
- Burgos JM, Altchek J, Bisio M, Duffy T, Valadares HMS, Seidenstein ME, Piccinali R, Freitas JM, Levin MJ, Macchi L, Macedo AM, Freilij H, Schijman AG.** Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol* 2007; 37:1319-1327.
- Burgos JM, Altchek J, Petrucelli N, Bisio M, Levin MJ, Freilij H, Schijman AG.** Molecular diagnosis and treatment monitoring of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* to twins of a triplet delivery. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65:58-61.
- Burgos JM, Díez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Bruses B, Favaloro L, Leguizamón MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favaloro R, Schijman AG.** Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis* 2010; 51:485-495.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Sáez-Alquezar A, Umezawa ES.** Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14:1045-1049.
- Câmara ACJ, Varela-Freire AA, Valadares HMS, Macedo AM, D'Ávila DA, Machado CR, Lages-Silva E, Chiari E, Galvão LMC.** Genetic analyses of *Trypanosoma cruzi* isolates from naturally infected triatomines and humans in northeastern Brazil. *Acta Trop* 2010; 115:205-211.
- Camargo ME.** Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1966; 8:227-234.
- Camargo ME, Hoshino S, Correa NS, Peres BA.** Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride, formalin-treated erythrocytes sensitized with *Trypanosoma cruzi* extracts. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1971; 13:45-50.
- Camussone C, González V, Belluzo MS, Pujato N, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS.** Comparison of recombinant *Trypanosoma cruzi* peptide mixtures versus multiepitope chimeric proteins as sensitizing antigens for immunodiagnosis. *Clin Vaccine Immunol* 2009; 16:899-905.

- Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Bula I, Girona-Llobera E, Jiménez-Marco T.** Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion* 2015; 55:1249-1255.
- Carlier Y, Sosa-Estani S, Luquetti AO, Buekens P.** Congenital Chagas disease: an update. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:363-368.
- Carlier Y, Torrico F.** Congenital infection with *Trypanosoma cruzi*: from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36:767-771.
- Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, Albajar Viñas P.** Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1250.
- Carlier Y, Truyens C.** Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop* 2015; 151:103-115.
- Carlier Y, Truyens C.** Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*. En: Telleira J, Tibayrenc M, editores. *American trypanosomiasis – Chagas disease. One hundred years of research.* 1a edición. Londres: Elsevier. 2010; p.539-581.
- Carlier Y, Truyens C, Deloron P, Peyron P.** Congenital parasitic infections: A review. *Acta Trop* 2012; 121:55-70.
- Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, Martínez CE, García C, Rodríguez M, Espinosa R, de Noya BA, Díaz-Bello Z, Herrera L, Fitzpatrick S, Yeo M, Miles MA, Feliciangeli MD.** Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1707.
- Carrilero B, Quesada JJ, Alfayete S, Segovia M.** Enfermedad de Chagas congénita en recién nacido de madre de origen boliviano. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27:486-487.
- Castro E.** Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfus Med* 2009; 19:16-23.
- Castro E.** Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas; iniciativas en Centro de Transfusión en España. *Enf Emerg* 2006; 8(Supl 1):48-50.
- Castro JA, Montalto de Mecca M, Bartel LC.** Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol* 2006; 25:471-479.
- Castro-Sesquen YA, Gilman RH, Galdos-Cardenas G, Ferruffino L, Sánchez G, Valencia Ayala E, Liotta L, Bern C, Luchini A, Working Group on Chagas disease in Bolivia and Perú.** Use of a novel Chagas Urine Nanoparticle Test (Chunap) for diagnosis of congenital Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8:e3211.
- Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Mejia C, Clark DE, Choi J, Reimer-McAtee MJ, Castro R, Valencia-Ayala E, Flores J, Bowman N, Castillo-Neyra R, Torrico F,**

- Liotta L, Bern C, Luchini A, Chagas/HIV Working Group in Bolivia and Peru.** Use of a Chagas Urine Nanoparticle Test (Chunap) to correlate with parasitemia levels in *T. cruzi*/HIV co-infected patients. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10:e0004407.
- Centers of Disease Control and Prevention.** Chagas disease after organ transplantation—Los Angeles, California, 2006. MMWR 2006; 55:798-800. Accesible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5529a3.htm>.
- Centers of Disease Control and Prevention.** Chagas disease after organ transplantation—United States, 2001. MMWR 2002; 51:210-212. Accesible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5110a3.htm>.
- Centers of Disease Control and Prevention.** Congenital transmission of Chagas disease—Virginia, 2010. MMWR 2012; 61:477-479. Accesible en: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6126a1.htm>.
- Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern (CDC-DPDx).** American Trypanosomiasis (*Trypanosoma cruzi*) Image Gallery. Accesible en: <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/gallery.html>.
- Cevallos AM, Hernández R.** Chagas' disease: pregnancy and congenital transmission. Biomed Res Int 2014; 2014:401864.
- Chacín C, Torres RG.** Estudio de la inserción de ADNk de *Trypanosoma cruzi* en el genoma de pacientes con enfermedad de Chagas. Univ Méd Bogotá (Colombia) 2010; 51:371-384.
- Chagas C.** Nova tripanozomiazé humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909; 1:159-218.
- Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW, Bryant JD, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO.** Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyser for blood donor screening. Transfusion 2006; 46:1737-1744.
- Chatelain E.** Chagas disease drug discovery: toward a new era. J Biomol Screen 2015; 20:22-35.
- Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, Kirchhoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO.** Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Clin Vaccine Immunol 2007; 14:355-361.
- Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA.** Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev Soc Bras Med Trop 1989; 22:19-23.
- Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, Morris MI, Nowicki M, Wright C, Ison MG.** Screening and treatment of Chagas

disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the Chagas in Transplant Working Group. *Am J Transplant* 2011; 11:672-680.

Chocair PR, Sabbaga E, Amato Neto V, Shiroma M, Goes GM. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1981; 23:280-282.

Cicora F, Ecurra V, Bibolini J, Petroni J, González I, Robert J. Cerebral trypanosomiasis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis* 2014; 16:813-817.

Consiglio Regionale Regione Toscana. Programma regionale per la prevenzione e il controllo della malattia di Chagas congenita: indicazioni per l'assistenza in gravidanza. Servizio Sanitario della Toscana, Regione Toscana, Firenze, Italia. 2012. Accesible en: http://servizi.salute.toscana.it/csr/img/getfile_img1.php?id=24147.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108:962-967.

Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions – A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:277-282.

Coura JR, Albajar Viñas P, Junqueira ACV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014; 109:856-862.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systematic review. *Acta Trop* 2010; 115:5-13.

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(Supl 1):31-40.

Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantification of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 129:53-59.

Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jiménez-Coello M, Calabuig E, Giménez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Málaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG. Multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for the identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in biological and clinical samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003765.

Cura CI, Lattes R, Nagel C, Gimenez MJ, Blanes M, Calabuig E, Iranzo A, Barcan LA, Anders M, Schijman AG. Early molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organ from *Trypanosoma cruzi*-infected donors. *Am J Transplant* 2013; 13:3253-3261.

Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, Lejona S, Brusés BL, Hernández DO, Severini GV, Velázquez E, Duffy T, Anchart E, Lattes R, Altcheh J, Freilij H, Díez M, Nagel C, Vigliano C, Favaloro L, Favaloro RR, Merino DE, Sosa-Estani S, Schijman AG. *Trypanosoma cruzi*

- Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology* 2012; 139:516-521.
- Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, Kjos S, Gurgel-Gonçalves R, Blanchet D, De Pablos LM, Tomasini N, Da Silva A, Russomando G, Cuba Cuba CA, Aznar C, Abate T, Levin MJ, Osuna A, Gürtler RE, Diosque P, Solari A, Triana-Chávez O, Schijman AG.** *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographic regions and transmission cycles based on microsatellite motifs of the intergenic spacer of spliced leader genes. *Int J Parasitol* 2010; 40:1599-1607.
- Cura CI, Schijman AG.** Relación entre los genotipados de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Rev Esp Salud Pública* 2013; 86:9-16.
- Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO.** Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 2001; 17:286-291.
- D'Ávila DA, Macedo AM, Valadares HMS, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LMC.** Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1718-1725.
- De Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, Shikanai-Yasuda MA.** Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop* 2011; 44:762-770.
- De Freitas JLP, Amato V, Sonntagn R, Biancalana A, Nussensweig V, Barreto JG.** Primeiras verificações de transmissão accidental da molestia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev Paul Med* 1952; 40:36-40.
- De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, Chiari E, Junqueira ACV, Fernandes O, Macedo AM, Machado CR, Pena SDJ.** Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog* 2006; 2:e24.
- De Marchi CR, Di Noia JM, Frasci AC, Amato Neto V, Almeida IC, Buscaglia CA.** Evaluation of a recombinant *Trypanosoma cruzi* mucin-like antigen for serodiagnosis of Chagas disease. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18:1850-1855.
- De Souza W.** A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(Supl 1):17-36.
- De Souza W.** Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 2002; 8:269-285.
- De Souza W.** Electron microscopy of trypanosomes – A historical review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; 103:313-325.
- De Souza W.** Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(Supl 1):89-100.

- Di Girolamo C, Martelli G, Ciannaméo A, Vocale C, Fini M, Stefanini A, Landini MP, Viale P, Verucchi G.** Chagas disease in a non-endemic country: a multidisciplinary research, Bologna, Italy. *J Immigrant Minority Health* 2016; 18:616-623.
- Díaz C, Nussenweig V, González A.** An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46:616-623.
- Díez CN, Manattini S, Zanuttini JC, Bottasso O, Marcipar I.** Short report: the value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in Northeastern Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78:624-627.
- Diosque P, Tomasini N, Lauthier JJ, Messenger LA, Monje Rumi MM, Ragone PG, Alberti-D'Amato AM, Pérez Brandán C, Barnabé C, Tibayrenc M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA, Yeo M.** Optimized Multilocus Sequence Typing (MLST) scheme for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8:e3117.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Díez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG.** Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3:e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramírez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Díaz Bello Z, Velázquez E, Muñoz-Calderón A, Juiz NA, Basile J, García L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, Alarcón de Noya B, Ribeiro I, Schijman AG.** 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:e2000.
- Elias MCQB, Vargas N, Tomazi L, Pedroso A, Zingales B, Schenkman S, Briones MRS.** Comparative analysis of genomic sequences suggests that *Trypanosoma cruzi* CL Brener contains two sets of non-intercalated repeats of satellite DNA that corresponds to *T. cruzi* I and *T. cruzi* II types. *Mol Biochem Parasitol* 2005; 140:221-227.
- Elias MCQB, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S.** Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 129:1-9.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Åslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Petterson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sánchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B.** The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005; 309:409-415.

- Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, Streiger M, Sosa-Estani S.** Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. PLoS Negl Trop Dis 2014; 8:e3312.
- Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallego GA, Guhl J.** Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. Acta Trop 2009; 110:15-21.
- Faraudo S, López N, Canela B, Guimarães A, Sáez-Alquezar A.** Evaluation in Brazil of the new Bio-Flash Chagas assay on Biokit's Bio-Flash analyzer. Rev Esp Salud Pública 2015; 2015:65-66.
- Favaloro LE, Peradejordi Lastra M, Nagel CB.** Capítulo 22. Enfermedad de Chagas y trasplantes de órganos. En: Viotti RJ, Vigliano CA. Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.303-320.
- Fearon MA, Scalia V, Huang M, Dines I, Ndao M, Lagacé-Wiens P.** A case of vertical transmission of Chagas disease contracted via blood transfusion in Canada. Can J Infect Dis Med Microbiol 2013; 24:32-34.
- Fernandes O, Mangia RH, Lisboa CV, Pinho AP, Morel CM, Zingales B, Campbell DA, Jansen AM.** The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitology 1999; 118:161-166.
- Fernández MDP, Cecere MC, Lanati LA, Lauricella MA, Schijman AG, Gürtler RE, Cardinal MV.** Geographic variation of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units from *Triatoma infestans* at different spatial scales. Acta Trop 2014; 140:10-18.
- Ferraz AS, Figueredo JFC.** Transmission of Chagas' disease through transplanted kidney: occurrence of the acute form of the disease in two recipients from the same donor. Rev Inst med Trop S Paulo 1993; 35:461-463.
- Ferrer E.** Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Saber 2015; 27:359-371.
- Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M.** Comparación de técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013; 31:277-282.
- Fife Jr EH, Muschel LH.** Fluorescent antibody technique for serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection. Proc Soc Exp Biol Med 1959; 101:540-543.
- Figueredo JFC, Martínez R, da Costa JC, Moysés Neto M, Suaid HJ, Ferraz AS.** Transmission of Chagas disease through renal transplantation: report of a case. Trans R Soc Trop Med Hyg 1990; 84:61-62.
- Flévaud L, Brum L, Bosch M, Perotti C, Contreras R, Saint-Sauveur JF.** New diagnostic strategies are required to increase coverage of treatment of patients affected by Chagas disease. Rev Enf Emerg 2016; 15:32-35.

- Flores-Chávez M, Cruz I, Nieto J, Gárate T, Navarro M, Pérez-Ayala A, López-Vélez R, Cañavate C.** Sensitivity and specificity of an Operon Immunochromatographic test in serum and whole-blood samples for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in Spain, an area of nonendemicity. *Clin Vaccin Immunol* 2012; 19:1353-1359.
- Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, Cañavate C.** Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010; 28:284-293.
- Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C.** Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(Supl 3):29-37.
- Flores-Chávez M, Faez Y, Olalla JM, Cruz I, Gárate T, Rodríguez M, Blanc P, Cañavate C.** Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Case J* 2008a; 1:302.
- Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, Cruz I, Gárate T, Cañavate C.** Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis* 2008b; 46:e44-e47.
- Flores-Chávez MD, Merino FJ, García-Bujalance S, Martín-Rabadán P, Merino P, García-Bermejo I, Delgado A, Cuadros J, Working Group on Chagas Disease of Autonomous Community of Madrid.** Surveillance of Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. *Euro Surveill* 2011; 16:pii=19974.
- Forés R, Sanjuán I, Portero F, Ruiz E, Regidor C, López-Vélez R, Linares M, Gil S, Ojeda E, Krsnik I, Bautista G, Vallejo C, García-Marco J, Fernández MN, Cabrera JR.** Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transp* 2007; 39:127-128.
- Freilij H, Muller L, González Cappa SM.** Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1983; 18:327-330.
- Fumadó V, Juncosa T, Posada E, Fisa R, Gállego M, Gascón J.** Chagas pediátrico en zona no endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:293-296.
- Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, Nunes EV, Sanches MC, Guastini CM, Teixeira AR, Shikanai-Yasuda MA.** Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Int Health* 2008; 13:1527-1533.
- Gállego Berenguer J.** Capítulo 11.3. Mastigoforos hemotisulares. Orden kinetoplastida. En: Gállego Berenguer J. *Morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. 3a edición. Barcelona: Universitat de Barcelona. 2007; p.148-165.
- Galvão C, Justí SA.** An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera: Reduviidae). *Acta Trop* 2015; 151:116-125.

- García ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, González MS, Azambuja P.** Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J Insect Physiol* 2007; 53:11-21.
- Gascón J.** Mejorar el acceso al diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Enf Emerg* 2016; 15:30-31.
- Gascón J, Bern C, Pinazo MJ.** Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 2010; 115:22-27.
- Gascón J, Pinazo MJ.** Control de la transmisión vertical de *Trypanosoma cruzi* en España: principal reto de la patología importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2008; 26:607-608.
- Gascón J, Requena Méndez A, Pinazo Delgado MJ.** Capítulo 5. Enfermedad de Chagas en países no endémicos. En: Viotti RJ, Vigliano CA. *Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica*. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.57-67.
- Gascón J, Vilasanjuan R, Lucas A.** The need for global collaboration to tackle hidden public health crisis of Chagas disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12:393-395.
- Gaspar L, Moraes CB, Freitas-Junior LH, Ferrari S, Costantino L, Costi MP, Coron RP, Smith TK, Siqueira-Neto JL, McKerrow JH, Cordeiro-da-Silva A.** Current and future chemotherapy for Chagas disease. *Curr Med Chem* 2015; 22:4293-4312.
- Generalitat de Catalunya.** Protocolo de Cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, Barcelona, España. 2010. Accesible en: http://canalsalut.gencat.cat/web/.content/home_canal_salut/professionals/temes_de_salut/chagas/documents/arxiu/chagas_espanyol.pdf.
- Generalitat Valenciana.** Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de actuación en la Comunitat Valenciana. Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana, Valencia, España. 2009. Accesible en: <http://publicaciones.san.gva.es/publicaciones/documentos/V-5243-2008.pdf>.
- Gobierno de España.** Enfermedad de Chagas en personas procedentes de latinoamérica residentes en España. Ministerio de Sanidad y Política Social, Gobierno de España, Madrid, España. 2009. Accesible en: <http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/prevPromocion/promocion/migracion/docs/enfermedadChagas.pdf>.
- Gobierno Vasco.** Recomendaciones para la asistencia médica del adulto inmigrante. Departamento de Sanidad, Gobierno Vasco, Vitoria, España. 2008. Accesible en: http://www.osakidetza.euskadi.eus/contenidos/informacion/osk_publicaciones/es_publici/adjuntos/primaria/asistenciaInmigrante.pdf.

- Gomes YM, Lorena VMB, Luquetti AO.** Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done regard to diagnosis and follow up studies? Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(Supl 1):115-121.
- González-Torné MI, Rivera M, Camaño I, Norman F, Flores-Chávez M, Rodríguez-Gómez L, Fumadó V, García-López Hortelano M, López-Vélez R, González-Granado LI, García-Burguillo A, Santos MDM, Ávila O.** Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2013; 31:535-542.
- Gorla D, Noireau F.** Geographic distribution of Triatomine vectors in America. En: Telleria J, Tibayrenc M, editores. American trypanosomiasis – Chagas disease. One hundred years of research. 1a edición. Londres: Elsevier. 2010; p.209-231.
- Gourbière S, Dorn P, Tripet F, Dumonteil E.** Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. Heredity 2012; 108:190-202.
- Granjon E, Dichtel-Danjoy ML, Saba E, Sabino E, Campos de Oliveira L, Zrein M.** Development of a novel multiplex immunoassay multi-cruzi for the serological confirmation of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis 2016; 10:e0004596.
- Grant IH, Gold JWM, Wittner M, Tanowitz HB, Nathan C, Mayer K, Reich L, Wollner N, Steinherz L, Ghavimi F, O'Reilly RJ, Armstrong D.** Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. Ann Intern Med 1989; 111:849-851.
- Grinnage-Pulley T, Scott B, Petersen CA.** A mother's gift: congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* species. PLoS Pathog 2016; 12:e1005302.
- Guarro A, El-Kassab H, Jorba JM, Lobato A, Martín C, Castro M, Angrill R, Corcoy F, Riera C.** Un caso de transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Cataluña. Enf Emerg 2007; 9(Supl 1):28-30.
- Guerreiro C, Machado A.** Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Médico 1913; 27:225-226.
- Guhl F.** Chagas disease in Andean Countries. Mem Inst Oswaldo Cruz 2007; 102(Supl 1):29-37.
- Guhl F.** Epidemiología molecular de *Trypanosoma cruzi*. Rev Esp Salud Pública 2013; 1-8.
- Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD.** From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. Int J Parasitol 2014; 44:605-612.
- Guhl F, Ramírez JD.** *Trypanosoma cruzi* I diversity: Towards the need of genetic subdivision? Acta Trop 2011; 119:1-4.
- Guhl F, Vallejo GA.** *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920 – An updated review. Mem Inst Oswaldo Cruz 2003; 98:435-442.
- Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, Lagunes-Castro MS, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, Ramos-Ligonio A.** Highly discordant

- serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors* 2015; 8:466.
- Guzmán-Marín ES, Zavala-Castro JE, Acosta-Viana KY, Rosado-Barrera ME.** Importancia de la caracterización de cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Biomed* 1999; 10:177-184.
- Hernández S, Flores CA, Viana GM, Sánchez DR, Traina MI, Meymandi SK.** Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi* in Southern California. *Open Forum Infect Dis* 2016; 3:ofw227.
- Herrador Z, Rivas E, Gherasim A, Gómez-Barroso D, García J, Benito A, Aparicio P.** Using hospital discharge database to characterize Chagas disease evolution in Spain: there is a need for a systematic approach towards disease detection and control. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003710.
- Herwaldt BL.** Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:659-688.
- Hofflin JM, Sadler RH, Araújo FG, Page WE, Remington JS.** Laboratory-acquired Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81:437-440.
- Holguín A, Norman F, Martín L, Mateos ML, Chacón J, López-Vélez R, Pérez-Molina JA.** Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol* 2013; 20:1197-1202.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P.** Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2014; 121:22-33.
- Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, Neofytos D, Ketterer D, Striker R, Silveira F, Qvarnstrom Y, Steurer F, Herwaldt B, Montgomery S.** Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. *Am J Transplant* 2013; 13:2418-2425.
- Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-Hernández M.** ARCHITECT Chagas: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30:463-465.
- Ienne S, Pedroso A, Carmona e Ferreira R, Briones MRS, Zingales B.** Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect Genet Evol* 2010; 10:601-606.
- Imai K, Maeda T, Sayama Y, Mikita K, Fujikura Y, Misawa K, Nagumo M, Iwata O, Ono T, Kurane I, Miyahira Y, Kawana A, Miura S.** Mother-to-child transmission of congenital Chagas disease, Japan. *Emerg Infect Dis* 2014; 20:146-148.
- Izquierdo L, Ferreira Marques A, Gállego M, Sanz S, Tebar S, Riera C, Quintó L, Aldasoro E, Almeida IC, Gascón J.** Evaluation of a chemiluminescent enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in a nonendemic setting. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108:928-931.

- Jackson Y, Chappuis F.** Chagas disease in Switzerland: history and challenges. *Euro Surveill* 2011; 16:pii=19963.
- Jackson Y, Myers C, Diana A, Marti HP, Wolff H, Chappuis F, Loutan L, Gervaix A.** Congenital transmission of Chagas disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis* 2009; 15:601-603.
- Jackson Y, Pinto A, Pett S.** Chagas disease in Australia and New Zealand: risks and needs for public health interventions. *Trop Med Int Health* 2014a; 19:212-218.
- Jackson Y, Varcher Herrrera M, Gascón J.** Economic crisis and increased immigrant mobility: new challenges in managing Chagas disease in Europe. *Bull World Health Organ* 2014b; 287:771-772.
- Jazín EE, Luquetti AO, Rassi A, Frasc AC.** Shift of excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* during human Chagas' disease. *Infect Immun* 1991; 59:2189-2191.
- Juiz NA, Cayo NM, Burgos M, Salvo ME, Nasser JR, Búa J, Longhi SA, Schijman AG.** Human polymorphisms in placentally expressed genes and their association with susceptibility to congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 2016; 213:1299-1306.
- Junqueira ACV, Degrave W, Brandão A.** Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol* 2005; 21:270-272.
- Junta de Andalucía.** Proceso Asistencial Integrado. Embarazo, parto y puerperio. Consejería de Igualdad, Salud y Políticas Sociales, Junta de Andalucía, Sevilla, España. 2014. Accesible en: http://www.juntadeandalucia.es/salud/export/sites/cs salud/galerias/documentos/p_3_p_3_procesos_asistenciales_integrados/embarazo_parto_puerperio_nuevo/embarazo_parto_puerperio_septiembre_2014.pdf.
- Kinoshita-Yanaga AT, Toledo MJDO, Araújo SM, Vier BP, Gomes ML.** Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow up by the polymerase chain reation: case report. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2009; 51:295-298.
- Knierim P, Sandoval J, Muñoz E.** Reacción de hemaglutinación indirecta en la enfermedad de Chagas crónica. *Bol Chil Parasitol* 1973; 28:54-57.
- Kransdorf EP, Zakowski PC, Kobashigawa JA.** Chagas disease in solid organ and heart transplantation. *Curr Opin Infect Dis* 2014; 27:418-424.
- Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M, Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team.** Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis* 2009; 48:1534-1540.
- Lapa JS, Saraiva RM, Hasslocher-Moreno AM, Georg I, Souza AS, Xavier SS, do Brasil PE.** Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practise. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31:965-974.
- Lattes R, Lasala MB.** Chagas disease in the immunosuppressed patient. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:300-309.

- Leiby DA, Lenes BA, Tibbals MA, Tames-Olmedo MT.** Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med* 1999; 341:1237-1239.
- Leone JL, Viotti RJ.** Capítulo 1. Perspectiva histórica. En: Viotti RJ, Vigliano CA. Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.3-16.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto CM, Serrano MG, Buck GA, Camargo EP, Teixeira MMG.** Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* 2015; 166-177.
- Liu Q, Zhou XN.** Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect Dis Poverty* 2015; 4:60.
- Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, Torrico F, Diosque P, Valente V, Valente SA, Gaunt MW.** Genome-scale multilocus microsatellite typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I reveals phylogeographic structure and specific genotypes linked to human infection. *PLoS Pathog* 2009; 5:e1000410.
- López-Chejade P, Fisa R, Gállego M, Iniesta L, Riera C, Portús M, RIVEMTL.** Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la población procedente de zona endémica en Barcelona. Valoración de las pruebas de diagnóstico utilizadas. *Enferm Emerg* 2005; 8(Supl 1):32-34.
- Macedo AM, Oliveira RP, Pena SDJ.** Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4:1-16.
- Macedo AM, Pena SDJ.** Genetic variability of *Trypanosoma cruzi* implications for the pathogenesis of Chagas disease. *Parasitol Today* 1998; 14:119-124.
- Macina RA, Sánchez DO, Gluschkof DA, Burrone OR, Frasc ACC.** Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1986; 21:25-32.
- Magill AJ, Reed SG.** Chapter 94. American Trypanosomiasis. En: Strickland GT, editor. *Hunter's Tropical medicine and emerging infectious diseases*. 8a edición. Filadelfia: W. B. Saunders. 2000; p.653-664.
- Mallimaci MC, Sosa-Estani S, Russomando G, Sánchez Z, Sijvarger C, Álvarez IM, Barrionuevo L, López C, Segura EL.** Short report: Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina. *Amb J Trop Med Hyg* 2010; 82:55-59.
- Manzardo C, Treviño B, Gómez i Prat J, Cabezos J, Monguí E, Clavería I, Del Val JL, Zabaleta E, Zarzuela F, Navarro R.** Communicable diseases in the immigrant population attended to in a tropical medicine unit: epidemiological aspects and public health issues. *Travel Med Infect Dis* 2008; 6:4-11.

- Marcili A, Lima L, Cavazzana Jr M, Junqueira ACV, Veludo HH, da Silva FM, Campaner M, Paiva F, Nunes VLB, Teixeira MMG.** A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology* 2009; 136:641-655.
- Marcipar IS, Lagier CM.** Chapter 17. Advances in serological diagnosis of Chagas' disease by using recombinant proteins. En: Alfonso Rodríguez-Morales, editor. *Current Topics in Tropical Medicine*. InTech 2012; 273-298. Accesible en: <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-tropical-medicine/advances-in-serological-diagnosis-of-chagas-disease-by-using-recombinant-proteins>.
- Marcon GEB, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley JDS, de Almeida EA, Guariento ME, Costa SCB.** Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:39-43.
- Mazza S, Montana A, Benitez C, Juzin E.** Transmisión de "*Schizotrypanum cruzi*" al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. *Publ MEPRA* 1936; 28:41-46.
- Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Oliveira Júnior W, Gomes Y, Britto C.** Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors* 2015; 8:154.
- Merino FJ, Martínez-Ruiz, R, Olabarrieta I, Merino P, García-Bujalance, Gastañaga T, Flores-Chávez M, Grup de estudio de la enfermedad de Chagas de la Comunidad de Madrid.** Control de la infección por *Trypanosoma cruzi*/ Enfermedad de Chagas en gestantes latinoamericanas y sus hijos. *Rev Esp Quimioter* 2013; 26:253-260.
- Messenger LA, Llewellyn MS, Bhattacharyya T, Franzén O, Lewis MD, Ramírez JD, Carrasco HJ, Andersson B, Miles MA.** Multiple mitochondrial introgression events and heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* revealed by maxicircle MLST and next generation sequencing. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1584.
- 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* 2015a; 13:995-1029.
- Messenger LA, Miles MA.** Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2015; 151:150-155.
- Messenger LA, Yeo M, Lewis MD, Llewellyn MS, Miles MA.** Molecular genotyping of *Trypanosoma cruzi* for lineage assignment and population genetics. *Methods Mol Biol* 2015b; 1201:297-337.
- Miles MA.** Chagas disease (American Trypanosomiasis). Section 6. *International medicine: major tropical syndromes: systematic infections*. En: Cohen J, Powderly WG, Opal SM editores. *Infectious diseases*. 4a edición. China: Elsevier. 2017; p.1065-1072.

- Miles MA.** Chapter 74. American Trypanosomiasis (Chagas disease). En: Cook GC, Zumla A, editores. Manson's Tropical diseases. 21a edición. Filadelfia: W.B. Saunders. 2003; p.1325-1337.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL.** The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. Parasitology 2009; 136:1509-1528.
- Miles MA, Souza A, Povoá 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; 272:819-821.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC, Godfrey DG.** The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 1977; 71:217-225.
- Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A.** Randomized trial of Posaconazole and Benznidazole for chronic Chagas' disease. N Engl J Med 2014; 370:1899-1908.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A.** Actualización en enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin 2016; 34:132-138.
- Moncayo A.** Revisión histórica de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en América Latina. Enf Emerg 2006; 8(Supl 1):11-13.
- Moncayo A, Silveira AC.** Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(Supl 1):17-30.
- Montgomery SP, Parise ME, Dotson EM, Bialek SR.** What do we know about Chagas disease in the United States? Am J Trop Med Hyg 2016; 95:1225-1227.
- Moreira D, López-García P, Vickerman K.** An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. Int J Syst Evol Microbiol 2004; 54:1861-1875.
- Morel C, Chiari E, Plessman Camargo E, Mattei DM, Romanha AJ, Simpson L.** Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77:6810-6814.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi Jr A, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velázquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Conolly SJ, Yusuf S, BENEFIT Investigators.** Randomized trial of Benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. N Engl J Med 2015; 373:1295-1306.

- Moscatelli G, Moroni S, García-Bournissen F, Ballering G, Bisio M, Freilij H, Altcheh J.** Prevention of congenital Chagas through treatment of girls and women of childbearing age. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:507–509.
- Moser DR, Kirchoff LV, Donelson JE.** Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1477-1482.
- Moure Z, Angheben A, Molina I, Gobbi F, Espasa M, Anselmi M, Salvador F, Tais S, Sánchez-Montalvá A, Pumarola T, Albajar-Viñas P, Sulleiro E.** Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clin Microbiol Infect* 2016; 22:788-792.
- Moya P, Basso B, Moretti E.** Enfermedad de Chagas congénita: Aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Experiencia de 30 años de seguimiento. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(Supl 2):33-40.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M.** Diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2013; 31(Supl 1):26-34.
- Murillo J, Bofill LM, Bolivar H, Torres-Viera C, Urbina JA, Benhayon D, Torres JR.** Congenital Chagas' disease transmission in the United States: diagnosis in adulthood. *IDCases* 2016; 5:72-75.
- Murta SM, Romanha AJ.** Characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(Supl 1):177-180.
- Muñoz C, Solari A, Apt W, Zulantay I.** Caracterización de las Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* según sus marcadores moleculares. *Rev Ibero-Latinoam Parasitol* 2013; 72:5-21.
- Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, del Pino M, Fumadó V, Bosch J, Posada EJ, Hernández S, Fisa R, Bogueña JM, Gállego M, Sanz S, Portús M, Gascón J.** Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis* 2009a; 48:1736-1740.
- Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, Ribera O, Molina I, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M, Gascón.** Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 2009b; 111:51-55.
- Muñoz J, Portús M, Corachan M, Fumadó V, Gascón J.** Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2007; 101:1161-1162.
- Muñoz-Vilches MJ, Salas J, Cabezas T, Metz D, Vázquez J, Soriano MJ.** Cribado de Chagas en mujeres gestantes latinoamericanas. Experiencia en el Poniente Almeriense. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012; 30:380-382.
- Nakazawa M, Rosa DS, Pereira VRA, Moura MO, Furtado VC, Souza WV, Barros MDNDS, Abath FGC, Gomes YM.** Excretory-secretory antigens of

- Trypanosoma cruzi* are potentially useful for serodiagnosis of chronic Chagas' disease. Clin Diagn Lab Immunol 2001; 8:1024-1027.
- Navarro M, Navaza B, Guionnet A, López-Vélez R.** Chagas disease in Spain: need for further public health measures. PLoS Negl Trop Dis 2012; 6:e1962.
- Navarro M, Pérez-Ayala A, Guionnet A, Pérez-Molina JA, Navaza B, Estévez L, Norman F, Flores-Chávez M, López-Vélez R.** Targeted screening and health education for Chagas disease tailored to at-risk migrants in Spain, 2007 to 2010. Euro Surveill 2011; 16:pii=19973.
- Nery-Guimarães F, Silva NN, Calusell DT, Mello AL, Rapone T, Snell T, Rodrigues N.** Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul). Hospital 1968; 73:1767-1804.
- Nickerson P, Orr P, Schroeder ML, Sekla L, Johnson JB.** Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. Ann Intern Med 1989; 111:851-853.
- Noireau F, Diosque P, Jansen AM.** *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res 2009; 40:26.
- Norman FF, López-Vélez R.** Chagas disease and breast-feeding. Emerg Infect Dis 2013; 19:1561-1566.
- Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T.** Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res 2000; 28:E63.
- Noya González O, Ruiz Guevara R, Díaz Bello Z, Alarcón de Noya B.** Epidemiología y clínica de la transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*. Rev Esp Salud Pública 2015; 2015:23-34.
- Ochs DE, Hnilica VC, Moser DR, Smith JH, Kirchhoff LV.** Postmortem diagnosis of autochthonous acute chagasic myocarditis by PCR amplification of a species-specific DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1996; 54:526-529.
- Oliveira I, Torrico F, Muñoz J, Gascón J.** Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. Expert Rev Anti Infect Ther 2010; 8:945-956.
- Oliveira RP, Broude NE, Macedo AM, Cantor CR, Smith CL, Pena SDJ.** Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95:3776-3780.
- Oliveira RP, Melo AIR, Macedo AM, Chiari E, Penja SDJ.** The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-repeat microsatellites. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 94(Supl 1):65-70.
- Ontañón A, Arroyo JL, Romon I, Amunarriz C, Hermosa V.** Evaluation of a strategy for *Trypanosoma cruzi* screening and its impact on blood donation. Vox Sanguinis 2007; 93(Supl 1):142.

- Organización Panamericana de la Salud.** Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD/425-0G 2006; 1-28.
- Organización Panamericana de la Salud/World Health Organization.** Información general de la enfermedad de Chagas. 2014. Accesible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=5856&Itemid=41506&lang=es.
- Ortí Lucas RM, Parada Barba MC.** Prevalencia de tripanosomiasis americana en mujeres gestantes de un área de salud. Valencia, 2005-2007. Rev Esp Salud Pública 2009; 83:543-555.
- Otani MM, Vinelli E, Kirchhoff LV, del Pozo A, Sands A, Vercauteren G, Sabino EC.** WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. Transfusion 2009; 49:1076-1082.
- Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, Martín-Nalda A, Figueras C.** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. Am J Trop Med Hyg 2012; 87:832-836.
- Paraguay.com.** Accesible en: <http://www.paraguay.com/salud-y-educacion/ops-certifica-a-paraguay-por-interrupcion-de-transmision-de-chagas-154706>.
- Patricio-Talayero JM, Benlloch-Mucharaz MJ, Collar-del-Castillo JI, Rubio-Soriano A, Serrat-Pérez C, Magraner-Egea J, Landa-Rivera L, Sánchez-Palomares M, Beseler-Soto B, Santos-Serrano L, Ferriol-Camacho M, Mut-Buigues J, Tomás-Vila M, Alonso-Jiménez MDC, Domínguez-Márquez V, Igual-Adell R.** Vigilancia epidemiológica de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas en tres maternidades de la Comunidad Valenciana. Enferm Infecc Microbiol Clin 2008; 26:609-613.
- Patterson JS, Guhl F.** Geographical distribution of Chagas disease. En: Telleria J, Tibayrenc M, editores. American trypanosomiasis – Chagas disease. One hundred years of research. 1a edición. Londres: Elsevier. 2010; p.83-114.
- Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascón J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi E, Hotez PJ.** The BENEFIT trial: where do we go from here? PLoS Negl Trop Dis 2016; 10:e0004343.
- Pehrson PO, Wahlgren M, Bengtsson E.** Asymptomatic congenital Chagas' disease in a 5-year-old-child. Scand J Infect Dis 1981; 13:307-308.
- Pérez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA.** Chagas disease: the challenge of polyparasitism? Trends Parasitol 2014; 30:176-182.
- Pérez-Ayala A, Pérez-Molina JA, Norman F, Navarro M, Monge-Maillo B, Díaz-Menéndez M, Peris-García J, Flores M, Cañavate C, López-Vélez R.** Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. Clin Microbiol Infect 2011; 17:1108-1113.

- Pérez de Pedro I, Martín Rico P, Santamaría S, Faez Y, Blanc P, Pascual MJ, Cuesta MA, Villalta MC, Muñoz Pérez MI, Vidales I, Heiniger AI.** Caso clínico de enfermedad de Chagas transfusional. *Enf Emerg* 2008; 10(Supl 1):1-18.
- Pérez-Molina JA, Pérez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R.** Old and new challenges in Chagas diseases. *Lancet Infect Dis* 2015; 15:1347-1356.
- Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Parola P, Jackson Y, Odolini S, López-Vélez R, EuroTravNet Network.** EuroTravNet: imported Chagas disease in nine European countries, 2008 to 2009. *Euro Surveill* 2011; 16:pii=19966.
- Picado A, Angheben A, Marchiol A, Alarcón de Noya B, Flévaud L, Pinazo MJ, Gállego M, Meymandi S, Moriana S.** Development of diagnostics for Chagas disease: where should we put our limited resources? *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11:e0005148.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Cortés-Lletget C, Posada EJ, Aldasoro E, Oliveira I, Muñoz J, Gállego M, Gascón J.** Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7:e1965.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Gállego M, López-Chejade P, Urbina JA, Gascón J.** Case report: successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82:583-587.
- Pinazo MJ, Gascón J.** The importance of the multidisciplinary approach to deal with the new epidemiological scenario of Chagas disease (global health). *Acta Trop* 2015; 151:16-20.
- Pinazo MJ, Posada EJ, Izquierdo L, Tassies D, Marques AF, de Lazzari E, Aldasoro E, Muñoz J, Abras A, Tebar S, Gállego M, de Almeida IC, Reverter JC, Gascón J.** Altered hypercoagulability factors in patients with chronic Chagas disease: potential biomarkers of therapeutic response. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10:e0004269.
- Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, Ramsey JM, Ribeiro I, Sosa-Estani S, López MC, Gascón J.** Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014; 12:479-496.
- Pinazo MJ, Thomas MC, Bustamante J, de Almeida IC, López MC, Gascón J.** Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:422-432.
- Pinto A, Pett S, Jackson Y.** Identifying Chagas disease in Australia: an emerging challenge for general practitioners. *Aust Fam Physician* 2014; 43:440-442.
- Pinto CM, Kalko EKV, Cottontail I, Wellinghausen N, Cottontail VM.** TcBat a bat exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol* 2012; 12:1328-1332.

- Pirón M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús M, Sauleda S.** Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007; 103:195-200.
- Pirón M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, Hernández JM, Puig L, Portús M, Gascón J, Sauleda S.** Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion* 2008; 48:1862-1868.
- Porrás AI, Yadon ZE, Altchek J, Britto C, Chaves GC, Flévaud L, Martins-Filho OA, Ribeiro I, Schijman AG, Shikanai-Yasuda MA, Sosa-Estani S, Stobbaerts E, Zicker F.** Target Product Profile (TPP) for Chagas disease point-of-care diagnosis and assessment of response to treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003697.
- Portús, M.** La enfermedad de Chagas en España. *Ars Pharm* 2010; 50:195-204.
- Praast G, Herzogenrath J, Bernhardt S, Christ H, Sickinger E.** Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 69:74-81.
- Prata A.** Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis* 2001; 1:92-100.
- Quijano-Hernández I, Dumonteil E.** Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccin* 2011; 7:1184-1191.
- Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ.** Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; 6:e1689.
- Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramírez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, Santalla J, da Matta Guedes PM, Peneau J, Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Álvarez-Martínez M, Martínez NE, Villarroel R, Villarroel S, Sánchez Z, Bisio M, Parrado R, da Cunha Galvão LM, Jácome da Câmara AC, Espinoza B, Alarcón de Noya B, Puerta C, Riarte A, Diosque P, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadón ZE, Schijman AG.** 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; 17:605-615.
- Ramírez JD, Duque MC, Montilla M, Cucunubá ZM, Guhl F.** Multilocus PCR-RFLP profiling in *Trypanosoma cruzi* I highlights an intraspecific genetic variation pattern. *Infect Genet Evol* 2012; 12:1743-1750.
- 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; 4:e899.
- Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, Restrepo S.** Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. *J Clin Microbiol* 2009; 47:3945-3951.

- Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, Cucunubá ZM.** First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health* 2014; 61:477-479.
- Ramos JM, Milla A, Rodríguez JC, López-Chejade P, Flores M, Rodríguez JM, Gutiérrez F.** Chagas disease in Latin American pregnant immigrants: experience in a non-endemic country. *Arch Gynecol Obstet* 2012; 285:919-923.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marcondes de Rezende J.** American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin N Am* 2012; 26:275-291.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA.** Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-1402.
- Rassi Jr A, Rassi A, Marin-Neto JA.** Chagas disease. En: Franco-Paredes C, Santos-Preciado JI, editores. *Neglected Tropical Diseases – Latin America and the Caribbean*. 1a edición. Nueva York: Springer-Verlag Wien. 2015; p.45-71.
- Recommendations from a satellite meeting.** *Mem Inst Oswaldo cruz* 1999; 94:429-432.
- Reithinger R, Tarleton RL, Urbina JA, Kitron U, Gürtler RE.** Eliminating Chagas disease: challenges and a roadmap. *BMJ* 2009; 338:b1283.
- Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J, Chagas disease COHEMI Working Group.** Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8:e3245.
- Requena-Méndez A, Aldasoro E, de Lazzari E, Sicuri E, Brown M, Moore DAJ, Gascón J, Muñoz J.** Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9:e0003540.
- Requena-Méndez A, Moore DA, Subirà C, Muñoz J.** Addressing the neglect: Chagas disease in London, UK. *Lancet Glob Health* 2016; 4:e231-e233.
- Riera C, Guarro A, El Kassab H, Jorba JM, Castro M, Angrill R, Gállego M, Fisa R, Martín C, Lobato A, Portús M.** Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75:1078-1081.
- Riera C, Vergés M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M.** Short report: identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:412-416.
- Riera C, Vergés M, López-Chejade P, Pirón M, Gascón J, Fisa R, Gállego M, Portús M.** Desarrollo y evaluación de una técnica ELISA con antígeno crudo de *Trypanosoma cruzi*. *Enf Emerg* 2009; 11:22-29.
- Ries J, Komarek A, Gottschalk J, Brand B, Amsler L, Jutzi M, Frey BM.** A case of possible Chagas transmission by blood transfusion in Switzerland. *Transfus Med Hemother* 2016; 43:415-417.
- Roca C, Pinazo MJ, López-Chejade P, Bayó J, Posada E, López-Solana J, Gállego M, Portús M, Gascón J, Chagas-Clot Research Group.** Chagas disease among

the Latin American adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1135.

Roca Saumell C, Soriano-Arandes A, Solsona Díaz L, Gascón Brustenga J, Grupo de consenso Chagas-APS. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Aten Primaria* 2015; 47:308-317.

Rodríguez P, Truyens C, Alonso-Vega C, Flores A, Cordova M, Suárez E, Torrico F, Carlier Y. Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-*Trypanosoma cruzi* in samples of blood from newborns from mother with positive serology for Chagas disease. *Rev Soc Bras Trop* 2005; 38(Supl 2):62-64.

Rodríguez-Guardado A, González ML, Rodríguez M, Flores-Chávez M, Boga JA, Gascón J. *Trypanosoma cruzi* infection in a Spanish liver transplant recipient. *Clin Microbiol Infect* 2015; 21:687.e1-687.e3.

Rojo Medina J. Enfermedades infecciosas transmitidas por transfusion. Panorama internacional y en México. *Gac Med Mex* 2014; 150:78-83.

Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoïn T, Brusca RC, Cavalier-Smith T, Guiry MD, Kirk PM. A higher level classification of all living organisms. 2015. *PLoS ONE* 2015; 10:e0119248.

Russomando G, Figueredo A, Almirón M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol* 1992; 30:2864-2868.

Ryan KA, Shapiro TA, Rauch CA, Englund PT. Replication of kinetoplast DNA in trypanosomes. *Ann Rev Microbiol* 1988; 42:339-358.

Salvador F, Len O, Molina I, Sulleiro E, Sauleda S, Bilbao I, Castells L, Pont T, Gavaldà J, Pahissa A. Safety of liver transplantation with Chagas disease-seropositive donors for seronegative recipients. *Liver Transpl* 2011; 17:1304-1308.

Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, Scollo K, Flórez C, Guzmán-Bracho C, Luquetti AO, Calvo N, Tadokoro K, Sáez-Alquezar A, Palma PP, Martín M, Flévaud L. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2506-2512.

Schenkman S, Pascoalino BDS, Nardelli SC. Nuclear structure of *Trypanosoma cruzi*. *Adv Parasitol* 2011; 75:251-283.

Schenone H. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94(Supl 1):289-294.

Schenone H, Gaggero M, Sapunar J, Contreras MC, Rojas A. Congenital Chagas disease of second generation in Santiago, Chile. Report of two cases. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; 43:231-232.

Schijman AG. Capítulo 13. Conceptos y utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. En: Viotti RJ, Vigliano CA. *Enfermedad de Chagas. Un enfoque*

- práctico basado en la investigación médica. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.173-186.
- Schijman AG, Altcheh, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H.** Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:441-449.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RH, Velázquez E, Tellez T, Sánchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramírez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, González CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chávez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J.** 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:e931.
- Schmunis GA.** Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102(Supl 1):75-85.
- Sicuri E, Muñoz J, Pinazo MJ, Posada E, Sánchez J, Alonso PL Gascón J.** Economic evaluation of Chagas disease screening of pregnant Latin American women and of their infants in a non endemic area. *Acta Trop* 2011; 118:110-117.
- Soriano-Arandes A, Angheben A, Serre-Delcor N, Treviño-Maruri B, Gómez i Prat J, Jackson Y.** Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. *Trop Med Int Health* 2016; 21:590-596.
- Sosa-Estani S.** Capítulo 4. Epidemiología de la enfermedad en países endémicos. En: Viotti RJ, Vigliano CA. *Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica.* 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.45-56.
- Sosa-Estani S, Segura EL.** Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem – A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:289-298.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B.** DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83:141-152.
- Souto RP, Zingales B.** Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62:45-52.
- Souza FF, Castro-e-Silva O, Marin-Neto JA, Sankarankutty AK, Teixeira AC, Martinelli ALC, Gaspar GG, Melo L, Figueredo JFC, Romano MMD, Maciel BC, Passos ADC, Rossi MA.** Acute chagasic miocardiopathy after orthotopic liver transplantation with donor and recipient serologically negative for *Trypanosoma cruzi*: a case report. *Transplant Proc* 2008; 40:875-878.

- Stanaway JD, Roth G.** The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Glog Heart* 2015; 10:139-144.
- Steindel M, Dias Neto E, de Menezes CLP, Romanha AJ, Simpson AJG.** Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 60:71-80.
- Steverding D.** The history of Chagas disease. *Parasit Vectors* 2014; 7:317.
- Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O.** Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol* 2014; 103:1-10.
- Strout RG.** A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* 1962; 48:100.
- Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L.** Sensitive detection of schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol* 1989; 33:205-214.
- Teixeira ARL, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N.** Pathogenesis of Chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. *Clin Microbiol Rev* 2011; 24:592-630.
- Telleria J, Biron DG, Brizard JP, Demetree E, Séveno M, Barnabé C, Ayala FJ, Tibayrenc M.** Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:20411-20416.
- Telleria J, Lafay B, Virreira M, Barnabé C, Tibayrenc M, Svoboda M.** *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. *Exp Parasitol* 2006; 114:279-288.
- Thekisoe OMM, Kuboki N, Nambota A, Fujisaki K, Sugimoto C, Igarashi I, Yasuda J, Inoue N.** Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. *Acta Trop* 2007; 102:182-189.
- Tibayrenc M.** Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 1998; 28:85-104.
- Tibayrenc M.** Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis* 2003; 2:12.
- Tibayrenc M, Ayala FJ.** Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. Genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution* 1988; 42:277-292.
- Tibayrenc M, Ayala FJ.** The populations genetics of *Trypanosoma cruzi* revisited in the light of the predominant clonal evolution model. *Acta Trop* 2015; 151:156-165.
- Tibayrenc M, Ayala FJ.** Towards a population genetics of microorganisms: the clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today* 1991; 7:228-232.

- Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ.** Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:1335-1339.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ.** Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83:115-119.
- Tomasini N, Diosque P.** Evolution of *Trypanosoma cruzi*: clarifying hybridisations, mitochondrial introgressions and phylogenetic relationships between major lineages. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:403-413.
- Torríco F.** Capítulo 9. Chagas congénito. En: Viotti RJ, Vigliano CA. *Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica*. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.117-128.
- Torríco F.** Criterios de uso de las pruebas serológicas para la enfermedad de Chagas en la práctica clínica. *Enf Emerg* 2011; 3(Supl 1):9-13.
- Torríco F.** Proof-of-concept study of E1224 to treat adult patients with Chagas disease. 62nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Washington DC, 2013. ClinicalTrials.gov Identifier NCT1489228. Accesible en: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01489228?term=e1224+chagas&rank=1>ClinicalTrials.govIdentifierNCT01489228.
- Torríco F, Alonso-Vega C, Suárez E, Rodríguez P, Torríco MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y.** Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 2004; 70:201-209.
- Torríco F, Gascón J, Alonso-Vega C, Santina G, Pinazo MJ, Ribeiro I.** Diseño de un estudio clínico fase II de prueba de concepto del E1224, un Nuevo fármaco candidato para el tratamiento de pacientes adultos con enfermedad de Chagas. *Rev Esp Salud Publ* 2014; 88(Supl):17-21.
- Torríco MC, Solano MA, Córdova M, Suárez E, Torríco F.** Diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas: de la teoría a la práctica. *Enf Emerg* 2011; 13(Supl 1):33-38.
- Torríco MC, Solano M, Guzmán JM, Parrado R, Suárez E, Alonso-Vega C, Truyens C, Carlier Y, Torríco F.** Estimación de la parasitemia en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*: las altas parasitemias están asociadas con la severa y fatal enfermedad de Chagas congénita. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(Supl 2):58-61.
- Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, González A, Rangel-Aldao R, Zingales B, Luquetti AO, da Silveira JF.** An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion* 2003; 43:91-97.

- Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henríquez D, Revollo S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, da Silveira JF.** Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. *J Clin Microbiol* 2004; 42:449-452.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper Jr N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira ACV, Camargo ME.** Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1996; 34:2143-2147.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Stolf AMS.** Enzyme-linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted antigens (TESA-ELISA) for serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001; 39:169-176.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, d'Ávila Reis D, Macedo AM, Adad SJ, Tostes Jr S, Moreira MC, Filho GB, Pensa SD.** 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; 156:1805-1809.
- Vega Chirinos S, Náquira Velarde C.** Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la Trypanosomiasis Americana (enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud y Instituto de Salud. Lima, Perú. 2005. Accesible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/Manual_Enfermedades_Chagas.pdf.
- Velázquez EB, Rivero R, De Rissio AM, Malagrino N, Esteva MI, Riarte AR, Ruiz AM.** Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop* 2014; 137:195-200.
- Vigliano CA, González PH, Viotti RJ.** Capítulo 15. Patología de las complicaciones cardíacas y de la reactivación. En: Viotti RJ, Vigliano CA. Enfermedad de Chagas. Un enfoque práctico basado en la investigación médica. 1a edición. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Médica Panamericana. 2015; p.209-222.
- Villalba R, Fornés G, Álvarez MA, Román J, Rubio V, Fernández M, García JM, Viñals M, Torres A.** Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis* 1992; 14:594-595.
- Viotti R, Alarcón de Noya B, Araújo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, Ramsey JM, Ribeiro I, Schijman AG, Sosa-Estani S, Torrico F, Gascón J, Latin American Network for Chagas disease, NHEPACHA.** Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58:635-639.
- Virreira M, Martínez S, Alonso-Vega C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, Parrado R, Truyens C, Carlier Y, Svoboda M.** Short report: Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2006; 75:1082-1084.

- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M.** Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68:574-582.
- Voelker R.** Congenital Chagas disease reported in United States. *JAMA* 2012; 308:443.
- Voller A, Draper C, Bidwell DE, Bartlett A.** Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet* 1975; 1:426-428.
- Volta BJ, Russomando G, Bustos PL, Scollo K, De Rissio AM, Sánchez Z, Cardoni RL, Bua J.** Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother-child binomial samples. *Acta Trop* 2015; 147:31-37.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR.** Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 2005; 171:527-543.
- Wikimedia Commons.** Accesible en:
https://commons.wikimedia.org/w/index.php?search=carlos+chagas&title=Special:Search&go=Go&uselang=ca&searchToken=ak1js65o962zzzectv2iquzhv#/media/File:Carlos_chagas_2.jpg.
- Wincker P, Britto C, Borges Pereira J, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM.** Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51:771-777.
- World Health Organization.** Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; 90:33-44.
- World Health Organization.** Control of Chagas disease: second report of the WHO expert committee. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2002; 905:1-109.
- World Health Organization.** Research priorities for Chagas disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2012; 975:1-99.
- World Health Organization.** Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected diseases. *WHO Press* 2013; 1-14.
- World Health Organization.** Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data* 2010; 1-172.
- Xunta de Galicia.** Protocolo de cribado da enfermidade de Chagas en mulleres embarazadas: Revisión ano 2014. Servizo Galego de Saúde, Consellería de Sanidade, Xunta de Galicia, Santiago de Compostela, Spain. 2014. Accesible en: www.sergas.es/Asistencia-sanitaria/Protocolo-de-cribado-da-enfermidade-de-chagas-en-mulleres-embarzadas-Actualizacion-2014.

- Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, Bhattacharyya T, Diosque P, Carrasco HJ, Miles MA.** Multilocus Sequence Typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. PLoS Negl Trop Dis 2011; 5:e1049.
- Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E.** Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. Transfusion 2007; 47:540-544.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG.** A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104:1051-1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR.** The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol 2012; 12:240-253.

I com que no sabia que era imposible,

ho vaig fer.

Albert Einstein

