



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA
Departamento de Genética y Microbiología
Programa de Doctorado en Microbiología

Serodiscordancia en el diagnóstico de la infección por
***Trypanosoma cruzi* en área no endémica**

Tesis presentada por:

Zaira Moure García

Para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall
d'Hebron de Barcelona bajo la dirección de

Dr. Tomàs Pumarola Suñé y Dra. Roser Fisa Saladrigas

Tutora:

Dra. Carmen Muñoz Batet

Dr. Tomàs Pumarola

Dra. Roser Fisa

Dra. Carmen Muñoz

Zaira Moure

Barcelona, 2018



Universitat Autònoma
de Barcelona

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA

Departamento de Genética y Microbiología

Programa de Doctorado en Microbiología

Serodiscordancia en el diagnóstico de la infección por

***Trypanosoma cruzi* en área no endémica**

Zaira Moure García, 2018

Tomàs Pumarola Suñé, Catedrático del Departamento de Genética y Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona y Jefe del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, **Roser Fisa Saladrigas**, Profesora Titular de la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Facultad de Farmacia y Ciencias de la Alimentación de la Universidad de Barcelona y **Carmen Muñoz Batet**, Jefa de Sección del Departamento de Microbiología del Hospital de la Santa Creu y San Pau y Profesora titular del Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: **“Serodiscordancia en el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en área no endémica”**, presentado por la Licenciada en Farmacia y especialista en Microbiología y Parasitología Clínica, Zaira Moure García, ha sido realizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal que corresponda.

Directores de Tesis Doctoral:

Tutora:

Dr. Tomàs Pumarola Suñé

Dra. Roser Fisa Saladrigas

Dr. Carmen Muñoz Batet

En Barcelona, Julio de 2018

A todos los afectados por el mal de Chagas

AGRADECIMIENTOS

Primero quisiera agradecerles a mis directores de tesis, el Dr. Tomàs Pumarola y la Dra. Roser Fisa. A Tomàs por compartir su visión del mundo de la investigación y su experiencia. Gracias por hacer que me plantee preguntas como: “... y todo esto, ¿Para qué?”; y por darme la libertad de finalmente hacer lo que quería. Porque además de ser mi director has sido un gran jefe con el que ha sido un privilegio crecer. Gracias por tu apoyo y tu comprensión. A Roser, por darme la oportunidad de ser tu estudiante de doctorado sin apenas conocerme. Gracias por toda tu ayuda y tus consejos en la elaboración de esta tesis, por estar siempre disponible y accesible entendiendo mis otras responsabilidades y muy especialmente por tu cercanía.

Quisiera agradecer de una manera muy especial a Elena Sulleiro por su apoyo incondicional. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en lo que más me gustaba y por hacerme creer que esos serodiscordantes Sí importaban. Me acogiste siendo una “R1” rasa recién llegada al Servicio y enseguida me hiciste sentir parte de ese “grupo tropical” con el que tantas ganas tenía de trabajar. Desde luego sin tu ayuda esta tesis no hubiera sido posible. Muchísimas gracias por creer en mí. Espero poder seguir colaborando contigo desde la distancia. Me llevo una gran amiga.

A todos mis compañeros resis, en especial a Ari y a Lidia, por ser las mejores “resis inmediatas superiores” que uno podría desear. Que os voy a decir “primas”, son muchos los momentos compartidos... buenos, y menos buenos, pero echando la vista atrás todos los recuerdo con una sonrisa. Tengo tantas cosas por las que daros las gracias que no me darían los folios...

A Laura, mi compañera y amiga del spring final!! La forma en la que nos conocimos en aquel ECCMID de Copenhague ya nos auguraba un futuro prometedor! Me ha encantado vivir este final de etapa contigo. Espero poder seguir siendo testigo de cómo te haces vieja y llevarte a Asturias con ese acento tan pulido..

A Francesc, quién me hizo enamorarme de la medicina tropical allá por el año 2009 y la razón por la que me aventuré en todo esto de la Microbiología. Me has transmitido todo tu amor, entusiasmo y dedicación por un trabajo que según tus propias palabras para tí no es un trabajo.

A Mateu. Gracias por creer en mí, tirar de mí y haberme dado la oportunidad de trabajar y crecer contigo. Tienes una energía y una capacidad de trabajo que contagia a los que están a tu alrededor.

No quiero olvidarme del resto del equipo tropical. Muy especialmente a Isra, Nano y Adrián por hacerme sentir una más. Si me dicen hace unos años que iba a formar parte de ese equipo no me lo hubiera creído... Ni en mis mejores sueños!

A todos y cada uno de los adjuntos, técnicos y compañeros con los que me he ido encontrando durante mis años de formación en el Servicio de Microbiología. Me llevo un pedacito de todos. A Nieves Larrosa, gracias por tu ayuda y consejos durante la residencia, especialmente en esta última etapa.

A Sergio. Porque al final tendremos una tesis en Chagas y una en "Clostri" cada uno. Eres una parte muy grande de este trabajo. Gracias por tu paciencia y ayuda en todos los sentidos. Para mí eres un ejemplo de constancia, esfuerzo y positividad del que cada día aprendo.

Finalmente me gustaría agradecer el papel importantísimo de mi familia, por su apoyo incondicional y por ser mi mayor fan. Porque para ellos siempre soy la mejor haga lo que haga. Gracias por darme la libertad de ir escogiendo mi camino.

ABREVIATURAS

EC: Enfermedad de Chagas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

AVAD: Años de vida ajustados por discapacidad

UDT: Unidad discreta de tipificación

NK: Natural Killer

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

IFN- γ : Interferón γ

NNN: Nicolle-Novy-MacNeal

LIT: Infusión de hígado y triptosa

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ADN: Ácido desoxirribonucleico

qPCR: PCR a tiempo real o cuantitativa

LAMP: Amplificación isotérmica mediada por asas

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

HAI: Hemaglutinación indirecta

ELISA: Enzimoimmunoanálisis

TESA-blot: Trypomastigote excreted-secreted antigen-blot

WB: Western-blot

WB-IH: *WB in-house*

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

RIPA: Ensayo de radioinmunoprecipitación

BNZ: Benznidazol

NFX: Nifurtimox

HUVH: Hospital Universitario Vall d'Hebron

CTD: Hospital Sacro Cuore

ÍNDICE

RESUMEN	I
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Historia de la enfermedad	3
1.2. Epidemiología	4
1.3. <i>Trypanosoma cruzi</i> : Formas evolutivas y diversidad genética	6
1.4. Transmisión vectorial y ciclo biológico	9
1.5. Otras vías de transmisión	10
1.6. Patogenia	12
1.7. Manifestaciones clínicas	14
1.8. Diagnóstico	15
1.8.1. Diagnóstico parasitológico.....	15
1.8.2. Diagnóstico molecular	16
1.8.3. Diagnóstico serológico.....	18
1.8.4. Pruebas confirmatorias	22
1.9. Tratamiento	25
1.10. Control	26
1.11. Nuevas estrategias de diagnóstico, pronóstico y curación.....	27
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	31
2.1. Justificación del estudio	31
2.2. Objetivos	31
3. RESULTADOS	35
3.1. Capítulo 1: Serodiscordancia en la enfermedad de Chagas crónica: un problema real en países no endémicos.....	37
3.2. Capítulo 2: El reto de la serología discordante en enfermedad de Chagas: el papel de dos técnicas confirmatorias en casos no concluyentes	47

INDICE

4. DISCUSIÓN.....	59
5. CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS BIBIOGRÁFICAS.....	81

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es endémica en Latinoamérica, pero debido a los flujos migratorios de las últimas décadas se ha convertido en un problema de salud global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) el diagnóstico serológico de la infección por *Trypanosoma cruzi* se basa en la concordancia de dos técnicas serológicas de principios diferentes usadas en paralelo. Cuando los resultados son discrepantes se recomienda el uso de una tercera técnica confirmatoria no siempre disponible. El objetivo general de esta tesis es conocer la prevalencia de la serodiscordancia en pacientes latinoamericanos fuera de la zona endémica, y analizar el rendimiento de dos técnicas confirmatorias basadas en la metodología Western-blot (WB) para facilitar el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* en este grupo de población serodiscordante.

Como resultado del presente trabajo se ha podido concluir que con las técnicas de cribado actuales y siguiendo el algoritmo actual de la OMS, se detecta un porcentaje nada despreciable de pacientes sin un diagnóstico claro. Con el uso de una tercera técnica se confirma la infección en aproximadamente la mitad de los individuos. Estos hallazgos ponen de manifiesto la necesidad de desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas lo suficientemente sensibles y específicas para poder ser utilizadas en solitario, así como el establecimiento de una técnica confirmatoria al alcance de los centros de referencia fuera del área endémica.

ABSTRACT

Chagas disease is a parasitic zoonosis endemic in Latin America. However due to the migratory flows in the last decades, it has become a global concern. The serological diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection is based on the agreement of two different techniques used in parallel. This fact can lead, sometimes, to discordant results and when these results are persistent, the use of a third confirmatory technique is recommended.

The main objective of this Thesis is to know the prevalence of discrepant results in Latin American patients outside the endemic area, and to evaluate the performance of two different confirmatory techniques in this population group.

As a result of the present study it was possible to conclude that with the current screening techniques and following the diagnosis algorithm of the World Health Organization (WHO), a non-negligible percentage of patients without a clear diagnosis was found. According to our results, the use of a third technique confirms the infection in approximately half of the individuals with the implications that this entails. These findings highlight the need for the development of new diagnostic techniques sensitive and specific enough to be used alone, as well as the establishment of a confirmatory technique available in reference units inside and outside the endemic area.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Historia de la enfermedad

La enfermedad de Chagas (EC), causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*, fue descrita por primera vez en 1909 por el Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (1879-1934). El trabajo de este médico brasileño marcó un hito en la historia de la medicina ya que llegó a describir al agente causal de la enfermedad, su ciclo biológico, el vector trasmisor, los hospedadores, algunas de las manifestaciones clínicas y su epidemiología (Chagas, 1909).

Carlos Chagas, que se encontraba trabajando en el instituto de investigaciones biomédicas de su colega, el prestigioso médico Oswaldo Cruz, fue enviado a la pequeña ciudad de Lassance (Minas Gerais) cerca del río São Francisco, para combatir un brote de malaria entre los trabajadores de un nuevo ferrocarril que conectaba la ciudad de Belém en el Amazonas. Tras dos años en el terreno observó que unos insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* (conocidos en la zona por el nombre *barbeiros*) infestaban las casas rurales de la zona. En el tubo digestivo de estos insectos encontró unos protozoos flagelados a los que denominó *Schizotrypanum cruzi*. Tras identificar y describir el parásito Carlos Chagas lo encontró también en la sangre de varios animales domésticos y más tarde en una muestra de sangre de una niña de dos años, Berenice, que presentaba un cuadro febril. El médico brasileño fue nominado en dos ocasiones al Premio Nobel de Fisiología y Medicina (en 1913 y 1921), pero nunca lo consiguió.

A pesar de haber pasado más de 100 años de su descubrimiento, la EC sigue siendo un problema tanto social como para la salud pública en América Latina y está considerada como una de las enfermedades olvidadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). El estigma que supone dificulta su detección y su correcto control ya que, a menudo, los pacientes prefieren no conocer su estado (Pérez-Molina y Molina, 2017). Debido a su cronicidad, la EC se considera la infección parasitaria con mayor impacto económico en América Latina (OMS, 2007) con una carga de enfermedad estimada de 550.000 años de vida ajustados por discapacidad (AVAD), una medida que engloba tanto la mortalidad prematura (12.000 muertes por año) como la morbilidad (Stanaway y Roth, 2015).

1.2. Epidemiología

La EC es endémica en 21 países de Latinoamérica y ha sido tradicionalmente asociada a la pobreza y malas condiciones de vivienda de las áreas rurales, donde la transmisión vectorial es la principal ruta de contagio (OMS, 2017). Se calcula que en el mundo hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas, la mayoría de ellas en América Latina (OMS, 2017). Sin embargo, debido a los flujos migratorios de las últimas décadas, la EC se ha convertido en un problema de salud global (Figura 1).

Por motivos tanto lingüísticos como culturales, España es el país europeo que mayor número de personas provenientes del área endémica recibe y se estima que hay entre 50.000 y 70.000 personas infectadas (Muñoz et al., 2009; Gascon et al., 2010; Pérez-Ayala et al., 2011; Salvador et al., 2014) (Tabla 1). Estos movimientos poblacionales hacia zonas donde la enfermedad no es endémica tren consigo

nuevos desafíos tanto epidemiológicos como políticos y sociales. En ausencia del vector, las principales amenazas son las transfusiones de sangre, la transmisión congénita y el trasplante de órganos (Coura y Viñas, 2010; Gascon et al., 2010).

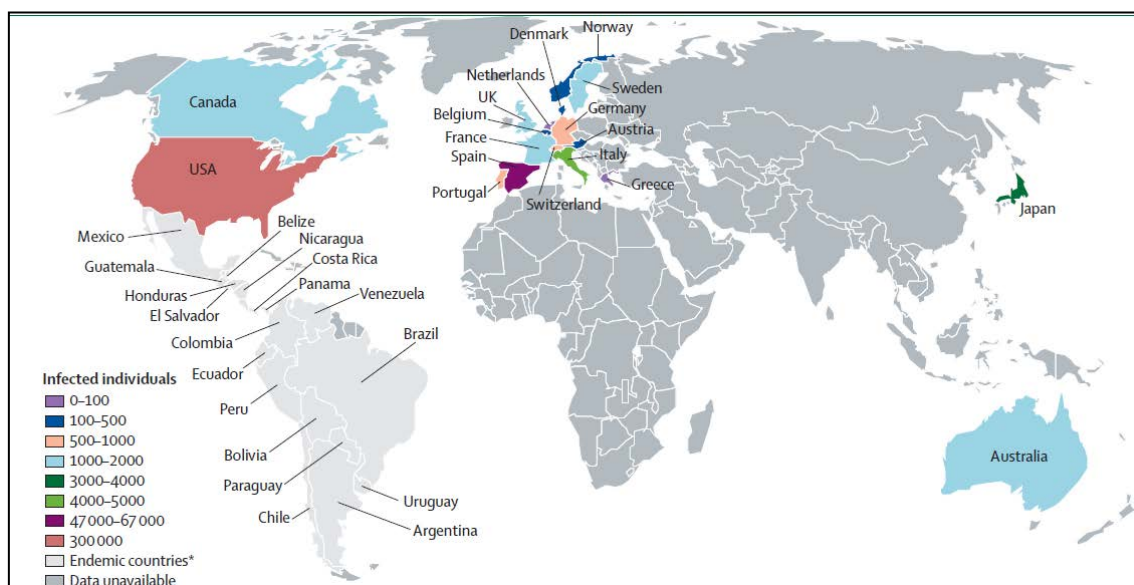


Figura 1. Número estimado de inmigrantes infectados que viven en países no endémicos (Rassi y Marin-Neto, 2010)

Tabla 1. Número estimado de inmigrantes infectados por *Trypanosoma cruzi* en España, basado en la población inmigrante por país de origen, y estimaciones de seroprevalencia de la Organización Panamericana de la Salud, 2006. (Gascon et al., 2010)

Country of origin	Estimated number of immigrants	Estimated <i>T. cruzi</i> prevalence	Estimated number of infected immigrants
Argentina	287,760	4.13%	11,882
Bolivia	238,605	6.75% (15%) ^a	16,106 (35,791) ^a
Brazil	140,942	1.02%	1,436
Chile	66,270	0.99%	653
Colombia	326,459	0.96%	3,121
Costa Rica	2,864	0.53%	15
Ecuador	451,072	1.74%	7,844
El Salvador	7,064	3.37%	238
Guatemala	5,821	1.98%	115
Honduras	23,512	3.05%	718
México	42,413	1.03%	436
Nicaragua	10,027	1.14%	114
Panama	4,214	0.01%	0
Paraguay	68,234	2.54%	1,735
Peru	160,603	0.69%	1,102
Uruguay	86,601	0.66%	568
Venezuela	142,709	1.16%	1,654
Total			47,738 (67,423) ^a

^a Mayor estimación basada en la prevalencia entre las mujeres evaluadas en dos estudios en hospitales españoles

El cribado de la EC no es universal en toda Europa. Esto, sumado a la naturaleza de la infección, a menudo asintomática, a la falta de familiaridad con ella y al estatus legal de muchos de los pacientes que no acuden a consulta, hace que la enfermedad esté infradiagnosticada (Pérez-Molina et al., 2015). Se calcula que el porcentaje de población infectada y diagnosticada en Europa no alcanza el 10% del total (Basile et al., 2011, Angheben et al., 2015). A falta de un sistema para reportar los casos de transmisión y enfermedad en todos los países europeos, es difícil estimar una cifra global real de infectados así como su impacto en los sistemas de salud (Requena-Méndez et al., 2015).

1.3. *Trypanosoma cruzi*: Formas evolutivas y diversidad genética

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi (Chagas, 1909) es un protozoo hemoflagelado perteneciente a la Clase Kinetoplastea Cavalier-Smith, 1981, Familia Trypanosomatidae Doflein, 1901 (Moreira et al., 2004). Posee un ciclo de vida complejo y heteroxénico en el que el parásito sufre cambios en su morfología, metabolismo y expresión génica a medida que pasa de unas formas evolutivas a otras (Figura 2). El tripomastigote metacíclico (en el vector) o hemático (en el huésped vertebrado), presenta un cuerpo alargado con un gran kinetoplasto en posición posterior y una membrana ondulante que termina en flagelo libre. La forma amastigota (1,5-4 μm), presenta un cuerpo redondeado y se encuentra dentro de las células de los mamíferos donde se divide por fisión binaria. El epimastigote (35-40 μm), forma replicativa en el vector y en medios de cultivo axénicos, presenta un cuerpo alargado con un kinetoplasto en la parte anterior al núcleo y una corta membrana ondulante con flagelo libre (Gállego Berenguer, 2007).

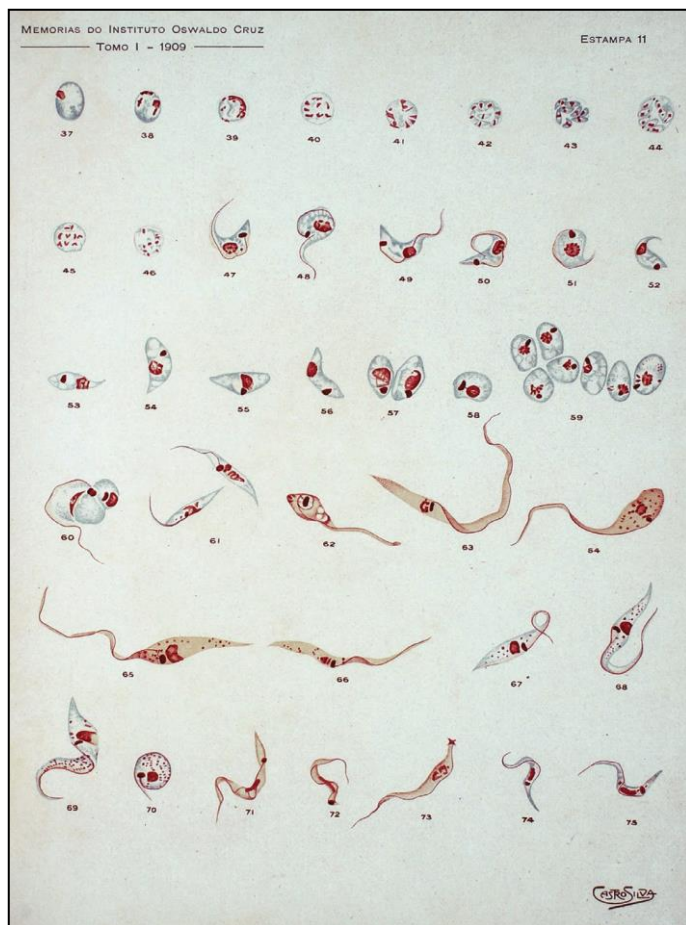


Figura 2. Reproducción de los dibujos originales de la primera descripción de *Trypanosoma cruzi* realizada por Carlos Chagas en 1909. (Souza, 2009)

T. cruzi es un organismo diploide que se multiplica predominantemente por fisión binaria (El-Sayed, 2005). Hoy en día se conocen eventos de recombinación y mutaciones puntuales que explican la estructura genético-poblacional actual del parásito (Brisse et al., 2003). El análisis genético molecular de *T. cruzi* ha permitido su clasificación en diferentes grupos denominados unidades discretas de tipificación (UDT) que se definen como “ *grupos genéticamente más relacionados entre ellos que con cualquier otro grupo y que pueden ser identificados por marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos comunes* ” (Tibayrenc, 1998). Dentro de su amplia

variabilidad se han descrito seis UDT diferentes, de Tc I a Tc VI, que presentan una distribución geográfica y ecológica determinada, variabilidad antigénica y distinto tropismo tisular (Zingales et al., 2012; Dutra et al., 2014).

Tc I es la UDT más ampliamente distribuida tanto en el ciclo selvático como en el doméstico. La infección en humanos por Tc I ocurre principalmente en América Central y se ha asociado a mayor daño cardíaco (Burgos et al., 2010) . Tc II, Tc V y Tc VI son las causantes de EC humana en la región del cono sur. Tc II predomina en la zona este y central de Brasil, Tc V en Argentina, Bolivia y Paraguay, y Tc VI en el Gran Chaco. Por su parte, Tc III y Tc IV se encuentran mayoritariamente en el ciclo selvático y la infección en humanos es excepcional (Zingales et al., 2012) (Figura 3).

Recientemente se ha descrito en Brasil, Colombia y Panamá un nuevo genotipo relacionado con murciélagos antropogénicos y también con infección en humanos. Esta nueva UDT, denominada TcBat, se postula como un posible ancestro de *T. cruzi* (Guhl et al., 2014).

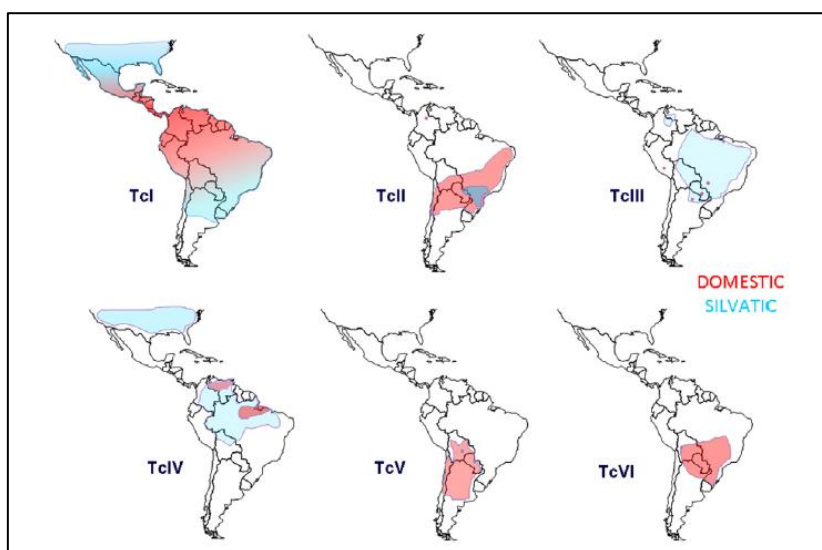


Figura 3. Distribución geográfica aproximada de las UDT de *Trypanosoma cruzi* en ciclos de transmisión domésticos y selváticos (Zingales et al., 2012)

1.4. Transmisión vectorial y ciclo biológico

Los vectores potenciales de *T. cruzi* presentan una amplia distribución geográfica desde el centro de Argentina y Chile hasta el sur de los EE.UU. Son reduvidos hematófagos obligados e incluyen más de 140 especies de la subfamilia Triatominae (Hemiptera, Reduviidae) (Zingales et al., 2012). De éstos, *Triatoma infestans*, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* y *Pastronylus megistus* se han adaptado a vivir en entornos domiciliarios y alimentarse con sangre de animales domésticos y humana definiendo así el ciclo peridoméstico de la enfermedad (Balouz et al., 2017).

Cuando el triatomino infectado se alimenta de sangre de un mamífero libera tripomastigotes metacíclicos en las heces. El parásito puede penetrar en el huésped a través de la piel (muchas veces propiciada por el propio rascado) o a través de mucosas, invadiendo así células nucleadas contiguas. Al invadir las células el tripomastigote pierde el flagelo y se transforma en la forma amastigota. Una vez dentro de la célula el amastigote comienza a dividirse hasta que ésta estalla liberándose de nuevo tripomastigotes a la sangre capaces de infectar nuevas células o bien diseminarse por el torrente circulatorio hacia nuevos tejidos (Bern, 2015). El ciclo se completa cuando un vector se alimenta de la sangre de un hospedador infectado adquiriendo las formas tripomastigotas, que en el intestino medio se transforman y multiplican como formas epimastigotas, y posteriormente migran hacia el intestino posterior y recto donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos (Figura 4).

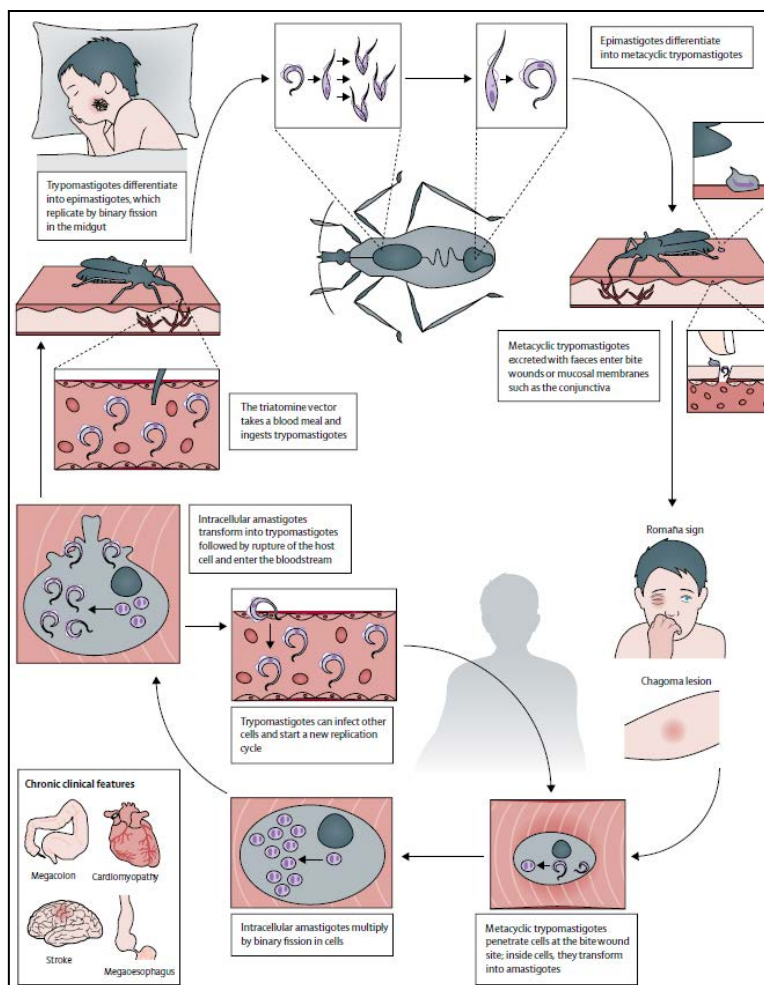


Figura 4. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* (Pérez-Molina y Molina, 2017)

1.5. Otras vías de transmisión

La EC también puede adquirirse por otras vías de transmisión, la mayoría de ellas muy importantes en zonas urbanas y países no endémicos: transfusión sanguínea, trasplante de órganos, transmisión vertical de madre a hijo, a través de alimentos contaminados y por accidentes de laboratorio (Murcia et al., 2013).

El riesgo de adquisición de la enfermedad por transfusión sanguínea es menor al 10-20%, y depende de varios factores, entre ellos la concentración de parásitos en sangre

del donante y el componente sanguíneo transfundido (Rassi y Marin-Neto, 2010). Se ha visto que la probabilidad de transmisión es mayor en la transfusión de concentrado de plaquetas que en la de otros componentes sanguíneos (Cancino-Faure et al., 2015). Este riesgo debe ser combatido con estrategias de salud como las basadas en el cribado en los bancos de sangre de donantes provenientes de países endémicos (Angheben et al., 2015).

La transmisión por donación de órganos también ha sido documentada. Las tasas de infección tras un trasplante de órgano sólido parecen ser más bajas para los receptores de riñón (0-19%) que para los receptores de hígado (0-29%) y los de corazón (75-100%) (Perez-Molina y Molina, 2018).

La transmisión congénita ocurre en aproximadamente el 5% de los embarazos de las mujeres infectadas crónicamente en Bolivia, Chile y Paraguay y en menos de un 1-2% en el resto de países endémicos. Estas diferencias pueden ser atribuibles a la heterogeneidad de los diferentes genotipos de *T. cruzi*, al estado inmunológico de las madres infectadas, a factores placentarios, o a diferencias entre las herramientas diagnósticas para detectar los casos congénitos (Rassi y Marin-Neto, 2010).

En área endémica la transmisión oral a través de alimentos contaminados con heces de triatominos, en la que se produce una ingestión masiva de parásitos, suele ser responsable de brotes asociados a una clínica aguda más severa y con una mayor mortalidad (Pereira et al., 2009; Alarcón de Noya et al., 2010).

1.6. Patogenia

En la fase aguda de la enfermedad, el daño orgánico se debe a la acción directa del parásito en los tejidos y a la respuesta inflamatoria aguda del hospedador. *T. cruzi* puede invadir cualquier tipo de célula nucleada pero tiene predilección por aquellas de origen mesenquimal (Perez-Molina y Molina, 2018).

Los mecanismos de patogénesis en la fase crónica aún son objeto de debate. Históricamente se han formulado dos hipótesis: 1) *T. cruzi* induce una respuesta autoinmune dirigida principalmente contra los tejidos del huésped y es independiente a la persistencia del parásito y / o 2) la persistencia del parásito en los tejidos da lugar a un proceso inflamatorio crónico que conduce a la destrucción de éstos (Kierszenbaum, 1999; Tarleton y Zhang, 1999). Actualmente se sabe que la patogenia de la EC es un proceso multifactorial (Viotti et al., 2014). La evidencia científica sugiere que la respuesta inmune inflamatoria del huésped junto con la virulencia y el tropismo de la UDT por el tejido son los dos determinantes más importantes de progresión (Bern, 2015). Mientras que la forma crónica asintomática representa un estado de equilibrio entre el huésped y el parásito, la forma sintomática representaría la pérdida de este equilibrio (Dutra et al., 2014).

El control de la infección desde el punto de vista inmunológico dependerá tanto de la respuesta innata como de la adquirida. Tras una entrada inmunológicamente silenciosa que involucra a macrófagos, células natural killer (NK), linfocitos T y B y la producción de citocinas Th-1 proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y el interferón γ (IFN- γ), *T. cruzi* provoca la activación de células B

policlonales, hipergammaglobulinemia y la producción de anticuerpos anti-*T. cruzi* inespecíficos ineficientes en el control de la infección (Machado et al., 2012; Cardoso et al., 2016). Más adelante, el establecimiento de una respuesta anti- *T. cruzi* CD8 + disfuncional, centrada en epítomos inmunodominantes del parásito, controla la parasitemia y la infección tisular, pero no logra eliminar por completo el parásito (Mateus et al., 2017). Este resultado no es perjudicial para el parásito, ya que reduce la mortalidad del huésped y mantiene la infectividad de éste (Cardoso et al., 2016).

Por otro lado el histotropismo del parásito, especialmente por el músculo cardiaco, y su papel en la patología de la enfermedad aún no ha sido clarificado. Algunos autores sostienen que *T. cruzi* invade las células del huésped al alterar una vía celular altamente conservada para la reparación de las lesiones de la membrana plasmática. Esta vía de reparación de la membrana plasmática es particularmente frecuente en las células musculares, lo que sugiere que el mecanismo utilizado por el parásito para la invasión celular puede ser un determinante primario del tropismo tisular, la persistencia intracelular y la patogenia de la enfermedad (Fernandes y Andrews, 2012). Aunque este tropismo ha sido demostrado en pacientes inmunosuprimidos (Burgos et al., 2008, 2010), es difícil establecer una relación entre la diversidad genética del parásito y las manifestaciones clínicas de la enfermedad debido a la complejidad de los estudios que se requieren.

1.7. Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas dependen de la fase de la infección. La fase inicial dura entre 4-8 semanas y suele ser asintomática o presentarse como un síndrome febril autolimitado. En el caso de presentar síntomas estos aparecen de 1 a 2 semanas tras la infección e incluyen fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. En raras ocasiones se aprecia una zona de inflamación cutánea (chancro) o un edema palpebral unilateral e indoloro (signo de Romaña) que indica el lugar de inoculación. Aunque esta fase pasa inadvertida en la mayoría de los casos, entre 1-5% de los pacientes desarrollan cuadros clínicos graves como la miocarditis, pericarditis o meningoencefalitis (Bern, 2015).

Una vez superada la fase aguda tiene lugar la fase crónica en la que a pesar de estar infectados, la mayoría de los individuos permanecen asintomáticos por lo que esta fase se denomina forma crónica indeterminada. Sin embargo, tras un periodo de 10-30 años se estima que entre un 30-40 % de los pacientes infectados desarrollarán la forma crónica sintomática caracterizada principalmente por afectación cardíaca, digestiva o ambas (Rassi y Marin-Neto, 2010). La forma determinada cardíaca es la más importante, debido a su frecuencia y gravedad. Sus manifestaciones se deben fundamentalmente a alteraciones de la conducción que dan lugar a arritmias, síncope e incluso muerte súbita (Perez-Molina y Molina, 2018). Por su parte las manifestaciones de la forma digestiva son debidas a la destrucción del plexo mientérico, que da lugar a trastornos motores y dilataciones (megaesófago y megacolon) (Coura y Borges-Pereira, 2010).

1.8. Diagnóstico

Actualmente no existe método de referencia para el diagnóstico de la EC y éste dependerá de la fase de la infección en la que nos encontremos.

1.8.1. Diagnóstico parasitológico

Durante la fase aguda la parasitemia es normalmente elevada por lo que el diagnóstico se basa fundamentalmente en la visualización del parásito a través del examen microscópico. Éste puede realizarse bien mediante observación directa de formas móviles de tripomastigote en gota de sangre fresca, o bien mediante extensión o gota gruesa teñidas con colorante Giemsa permitiendo observar la morfología del parásito (Flores-Chávez et al., 2007). Con el fin de aumentar la sensibilidad se dispone de técnicas de concentración como el método de Strout o el microhematocrito basadas en procedimientos de centrifugación (Strout, 1962; OMS, 2002). Durante años, el método de Strout ha sido utilizado en el diagnóstico de rutina en adultos mientras que el microhematocrito, o técnica del tubo capilar heparinizado, ha demostrado ser una buena herramienta en el diagnóstico de infección congénita (Carlier et al., 2011; Murcia et al., 2013)

Cuando la parasitemia es baja, como ocurre en la fase crónica, es posible recurrir a métodos de amplificación biológica como el hemocultivo o el xenodiagnóstico. El hemocultivo permite multiplicar el número de parásitos a partir de un pequeño volumen de sangre en medio tradicional de Nicolle-Novy- MacNeal (NNN) y/o Infusión de hígado y triptosa (LIT) (Córdova Rojas et al., 2015). Por su parte, el xenodiagnóstico consiste en alimentar insectos reducidos con sangre del paciente y tras

aproximadamente 30 días, examinar el tracto digestivo del insecto para comprobar la presencia de parásitos (Tanowitz et al., 1992). Ambas técnicas además de ser costosas y lentas presentan una baja sensibilidad que oscila entre 0 a 94% en el caso del hemocultivo y entre el 9% y el 87,5% cuando hablamos del xenodiagnóstico (Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda, 2003). Es por ello que el uso de estos métodos ha quedado relegado a institutos de investigación (Aguiar et al., 2011; Balouz et al., 2017).

1.8.2. Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha establecido como la herramienta de diagnóstico molecular de elección ya que aumenta considerablemente la sensibilidad del diagnóstico parasitológico tradicional (Piron et al., 2007; Schijman, 2018). Sin embargo, aún existe controversia sobre su interpretación ya que la detección de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) en sangre no representa necesariamente la existencia de parásitos viables (Cancino-Faure et al., 2016).

El diagnóstico molecular se utiliza fundamentalmente para: (i) el diagnóstico precoz de la transmisión congénita cuando la presencia de anticuerpos maternos puede llevar a resultados falsos positivos y la microscopía no tiene suficiente sensibilidad (ii) el diagnóstico de infección por transmisión oral (iii) la detección temprana de infección en receptores de órganos provenientes de donantes con EC, (iv) la monitorización de la reactivación por inmunodepresión en pacientes crónicamente infectados y (v) la evaluación de la respuesta al tratamiento, ya que la seroreversión serológica en pacientes tratados puede tardar años (Schijman, 2018). En el diagnóstico de la infección crónica, la PCR presenta baja y variada sensibilidad que oscila entre el 40% y

el 65% (Brasil et al., 2010). Los factores que contribuyen a esa variabilidad son el volumen sanguíneo, la metodología y la diana escogida, la fase de infección, el estado de inmunosupresión, y la diversidad genética de *T. cruzi* (Schijman et al., 2011).

En los últimos años se han propuesto diversas combinaciones de dianas moleculares, sets de cebadores y diferentes plataformas de extracción y amplificación (Schijman, 2003; Seiringer et al., 2017; Schijman, 2018). Tras varios estudios comparativos, multicéntricos e internacionales se ha visto que los mejores métodos para el diagnóstico son los basados en la amplificación de dos dianas representadas en un gran número de copias por genoma: la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto (kDNA) y la secuencia repetida de 195 pares de bases del ADN satélite (SatDNA) (Murcia et al., 2013). Como ambas dianas se encuentran representadas en un número de copias muy similar (10^4 copias), la sensibilidad de estas técnicas dependerá de la optimización de cada reacción; sin embargo ambos protocolos consiguen detectar inequívocamente el contenido genómico equivalente a un parásito (Flores-Chávez et al., 2007; Murcia et al., 2013).

Aunque no es muy utilizada en el diagnóstico de rutina, la introducción de la PCR cuantitativa o a tiempo real (qPCR) en los laboratorios permite la posibilidad de cuantificar la carga parasitaria (Piron et al., 2007; Duffy et al., 2009; Moreira et al., 2013). Se utilizan fluorocromos específicos intercalantes (SYBR Green) o bien sondas marcadas con fluorocromo (TaqMan) dirigidas al SatDNA o al kDNA con un control de amplificación interno (Duffy et al., 2013; Ramírez et al., 2015). En ensayos estandarizados la qPCR kDNA muestra una mayor sensibilidad analítica que qPCR

SatDNA, mientras que en muestras clínicas la concordancia de ambas técnicas es mayor (Ramírez et al., 2015).

Otra herramienta de diagnóstico molecular desarrollada en los últimos años es la amplificación isotérmica de ADN mediada por asas (LAMP). Gracias a un complejo diseño de cebadores, esta tecnología permite amplificar grandes cantidades de ADN en condiciones isotérmicas (60-65°C), usando una enzima termoestable, Bst (*Bacillus stearothermophilus*) ADN polimerasa, obteniendo resultados en aproximadamente una hora. La visualización de la amplificación se puede realizar a simple vista o bien midiendo la turbidez o fluorescencia usando agentes intercalantes (Thekiso et al., 2007).

1.8.3. Diagnóstico serológico

En individuos recientemente infectados el diagnóstico serológico es poco sensible debido al retraso de la respuesta inmune humoral (Zuniga et al., 2000). Además, existe un periodo ventana antes de que la inmunoglobulina IgM específica pueda ser detectada. Por otro lado, la mayoría de los kits comerciales no incluyen antígenos para la detección de IgM anti-*T. cruzi* lo que hace que la serología no sea el método de elección en esta fase de la infección (Flores-Chávez et al., 2006).

A diferencia de lo que sucede en la fase aguda, durante la infección crónica los individuos inmunocompetentes desarrollan una significativa respuesta humoral con una alta persistencia de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* a lo largo de la vida (Flores-Chávez et al., 2006) (Figura 5). En estas circunstancias y teniendo en cuenta que estos individuos presentan una parasitemia baja y oscilante, el diagnóstico se basa

en métodos inmunológicos que demuestren la presencia de inmunoglobulinas IgG anti-*T. cruzi* totales (Otani et al., 2009).

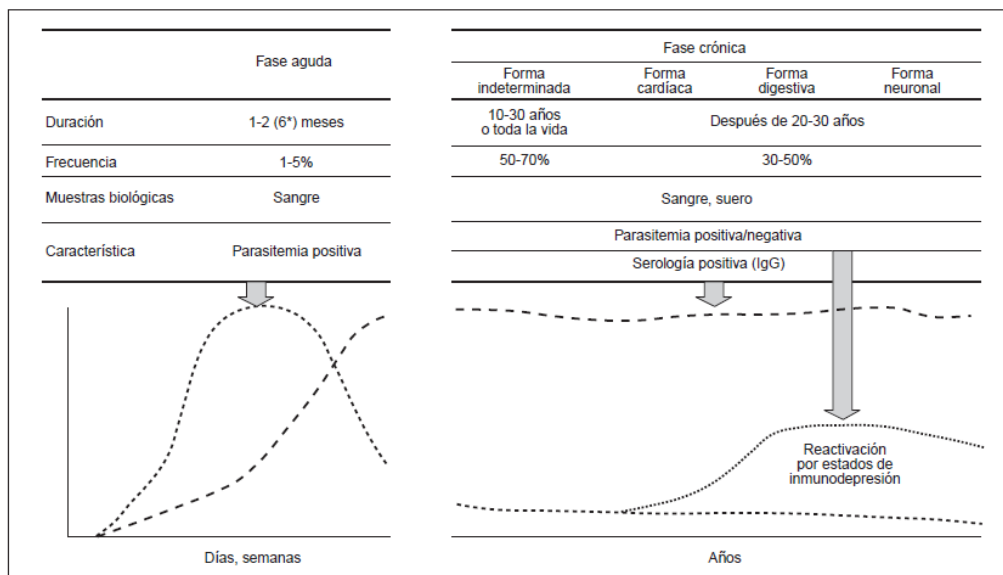


Figura 5. Relación de la dinámica de la parasitemia (línea de puntos) y los anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* (línea discontinua) en la infección por *T. cruzi*. *La duración de la fase aguda en la infección por transfusión sanguínea puede ser algo mayor al observado en la infección natural (Flores-Chávez et al., 2007)

A falta de una técnica lo suficientemente sensible y específica para poder ser utilizada en solitario, el diagnóstico de la EC crónica se basa en la concordancia de al menos dos pruebas serológicas basadas en diferentes principios o que utilicen diferente antígeno (OMS, 2002).

Los diferentes ensayos se clasifican dependiendo de si emplean lisado de parásito completo (convencionales), o si incluyen antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (no convencionales). Los métodos más utilizados son la hemaglutinación indirecta (HAI), la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) (OMS, 2002).

El hecho de utilizar una compleja mezcla de antígenos del parásito o bien el parásito completo en el diseño de los test convencionales favorece la detección de anticuerpos incluso cuando los niveles son bajos. En contraparte a este aumento de sensibilidad, con el uso de estas pruebas también aumenta la posibilidad de obtener resultados falsos positivos debido a la existencia de reacciones cruzadas con otros tripanosómidos como *Leishmania spp.* o *Trypanosoma rangeli* (Saez-Alquézar et al., 2000; Longhi et al., 2012). Asimismo, se han descrito reacciones cruzadas en pacientes con enfermedades autoinmunes, en individuos con enfermedades agudas y en mujeres embarazadas (Marcipar y Lagier, 2012).

Pueden existir discordancias de resultados entre los distintos métodos convencionales debido a la diferencia antigénica de su composición (Souza y Amato Neto, 2012). La IFI detecta anticuerpos específicos frente a antígenos de membrana y la HAI detecta anticuerpos que reaccionan frente a antígenos subcelulares por lo que presentan una diferente cronología en cuanto a la positividad (Souza y Amato Neto, 2012). Por su parte el ELISA convencional, aunque ofrece más flexibilidad en cuanto a su composición, suele usar extracto total del parásito como antígeno. La IFI es operador dependiente y de interpretación subjetiva y la HAI presenta una baja sensibilidad por lo que el ELISA se considera la técnica más adecuada por su alta sensibilidad y su capacidad de automatización. (Gadelha et al., 2003; Flores-Chávez et al., 2012).

Con el objetivo de aumentar la especificidad de los test convencionales y evitar las reacciones cruzadas, surgen los ensayos que incorporan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (Saez-Alquézar et al., 2000; Caballero et al., 2007). Con la inclusión de sólo un antígeno recombinante no se alcanza la sensibilidad requerida por lo que

una de las estrategias es la utilización de mezclas antigénicas diseñadas como una construcción única fusionando varios antígenos (da Silveira et al., 2001; Camussone et al., 2009). Pese al aumento de especificidad, algunos antígenos recombinantes pueden presentar aminoácidos semejantes a los de otros organismos, dando lugar a reactividad cruzada por mimetismo molecular (Saez-Alquóz et al., 2000) (Tabla 2).

Tabla 2. Sensibilidad y especificidad de algunas de las pruebas de detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Tabla extraída de Flores-Chávez, 2010.

	Chagásicos N.º positivos (total sueros)	Sensibilidad (IC del 95%)	No chagásicos N.º positivos (total sueros)	Especificidad 1 ^a (IC del 95%)	Otras enfermedades N.º de positivos (total sueros)	Especificidad 2 ^b (IC del 95%)
IFI-CNM	65 (66)	98,5 (94,8–100)	0 (97)	100 (99,5–100)	23 (60)	85,4 (79,5–91,2)
ELISA-CNM	66 (66)	100 (99,2–100)	0 (97)	100 (99,5–100)	18 (60)	88,5 (83,2–93,8)
Certest	66 (66)	100 (99,2–100)	0 (97)	100 (99,5–100)	25 (60)	84,1 (78,0–90,1)
Ortho	66 (66)	100 (99,2–100)	0 (97)	100 (99,5–100)	18 (60)	88,5 (83,2–93,8)
BLK	41 (42)	97,6 (91,8–100)	0 (74)	100 (99,3–100)	13 (60)	90,3 (84,9–95,7)
bioMérieux	66 (66)	98,5 (94,8–100)	0 (97)	100 (99,5–100)	9 (60)	94,3 (90,3–98,2)
Biokit	66 (66)	100 (99,2–100)	1 (97)	99 (96,4–100)	7 (60)	94,9 (91,2–98,7)
ID-PaGIA2	61 (66)	92,4 (85,3–99,6)	1 (97)	99 (96,4–100)	1 (60)	98,7 (96,7–100)
ID-PaGIA3	65 (66)	98,5 (94,8–100)	2 (97)	97,9 (94,6–100)	2 (60)	98,1 (95,6–100)
ICT Operon	61 (66)	92,4 (85,2–99,6)	2 (97)	97,9 (94,6–100)	10 (60)	92,4 (85,3–99,6)
ICT CTK	63 (66)	95,5 (89,7–100)	3 (97)	96,9 (93–100)	9 (60)	93 (88,7–97,3)

^a Especificidad calculada a partir de los datos de individuos no chagásicos (controles sanos)

^b Especificidad calculada teniendo en cuenta los resultados de todos los individuos no chagásicos de todos los paneles (controles sanos, leishmaniasis y malaria).

Recientemente se han desarrollado plataformas de nueva generación con sistemas de detección altamente sensibles basados en quimioluminiscencia y un alto grado de automatización como el CMIA ARCHITECT® Chagas Assay, que utiliza 4 proteínas recombinantes o el CLIA LIAISON® XL murex Chagas basado en una proteína multiantígeno (Flores-Chavez et al., 2014; Abras et al., 2016). La plataforma Elecsys® Chagas, basada en electroquimioluminiscencia ha demostrado ser una herramienta útil en el diagnóstico de la EC a pesar de que sólo incorpora 3 antígenos recombinantes. La novedad de esta plataforma es la clara separación de muestras reactivas *versus*

muestras no reactivas, hecho que disminuye significativamente el número de resultados no concluyentes (Flores-Chávez et al., 2018).

1.8.4. Pruebas confirmatorias

Los distintos métodos de diagnóstico pueden presentar diferencias en su rendimiento dependiendo, entre otros factores, de las preparaciones antigénicas utilizadas, la variabilidad genética de las cepas circulantes o la interindividualidad del hospedador (Silveira-Lacerda et al., 2004; de Souza et al., 2016). El hecho de usar dos técnicas diagnósticas puede dar lugar a resultados ambiguos o discordantes. Si los resultados se mantienen discordantes a lo largo del tiempo, la OMS propone realizar una tercera técnica confirmatoria (OMS, 2002).

En los últimos años varios autores han propuesto diferentes métodos para la confirmación de la EC cuando los resultados son inconclusos.

TESA-blot, un inmunoblot desarrollado por Umezawa y colaboradores, utiliza antígenos de excreción-secreción de tripomastigote de la cepa Y de *T. cruzi* y demuestra ser una herramienta útil tanto en infección aguda y congénita, como en confirmación en caso de serología discordante, con tasas de sensibilidad y especificidad cercanas al 100% en área endémica (Umezawa et al., 1996; Amato Neto et al., 2005; Picka et al., 2007; Zarate-Blades et al., 2007; Araújo et al., 2008; Furuchó et al., 2008). Las proteínas incluidas en el test son mayormente transalidasas que actúan como responsables de la penetración del tripomastigote en la célula hospedadora y son altamente inmunogénicas estimulando una fuerte respuesta de células B (Berrizbeitia et al., 2006). Además, al ser antígenos de superficie

predominantes en tripomastigotes circulantes, la forma humana, se espera una respuesta inmune más específica y por consiguiente un menor número de reacciones cruzadas que los test que utilizan antígenos de la forma epimastigote (Aznar et al., 1997). En la fase aguda la IgM reconoce bandas de antígenos de 130 a 200 kDa mientras que en fase crónica se reconocen antígenos de 150 a 160 kDa (Umezawa et al., 1996).

Una de las limitaciones de TESA-blot, aparte de que su comercialización se limita a Latinoamérica, es el coste de su producción. Las proteínas utilizadas en el test se obtienen infectando líneas celulares, por lo que se necesita personal entrenado en su mantenimiento e infección (Berrizbeitia et al., 2006). Además, debido a la dificultad de automatización de este método no resulta de utilidad en la rutina del diagnóstico de la infección por *T. cruzi*, especialmente en laboratorios con una alta carga asistencial donde se precisan técnicas de uso sencillo, rápidas y automatizadas.

El **Western-blot *in-house*** (WB-IH) desarrollado por Riera y colaboradores utiliza un extracto total de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa de Maracay) cultivado en medio de LIT (Riera et al., 2012). Al igual que el TESA-blot, el WB-IH presenta tasas de sensibilidad y especificidad cercanas al 100% fuera del área endémica y se ha propuesto como herramienta de utilidad tanto en el diagnóstico como en la confirmación de la EC (Riera et al., 2012). Los sueros de individuos infectados por *T. cruzi* reconocen un patrón homogéneo de bandas antigénicas correspondientes a 28, 32, 38, 39, 40 y 48 kDa independientemente de su título de anticuerpos. Por otro lado, los individuos infectados por *Leishmania* spp. presentan un patrón de reactividad heterogéneo de no

más de 4 bandas. Por tanto, un suero se considera positivo cuando reacciona con al menos 5 bandas antigénicas del patrón estándar (Riera et al., 2012).

La principal limitación de esta técnica *in-house* es la dificultad para realizar comparaciones entre laboratorios, debido a la heterogeneidad de las cepas y a las preparaciones antigénicas usadas. Además, puede haber variaciones adicionales dependientes de la preparación de geles que influirían en la separación de bandas y el establecimiento de los respectivos pesos moleculares (Riera et al., 2012).

Existen técnicas alternativas al WB propuestas para la confirmación del diagnóstico de la EC. El ensayo de radioinmunoprecipitación de glucoproteínas de 72 y 90 kDa (RIPA), es la técnica confirmatoria de referencia en los Estados Unidos, sin embargo su complejidad limita en gran parte su uso y se ve relegada a centros de referencia (Otani et al., 2009). Otro método propuesto recientemente es el Multi-cruzi test (InfYnity Biomarkers, Lyon, France) basado en impresión multiplexada dentro de microplacas ELISA de 96 pocillos cada uno incluyendo una matriz de doce antígenos (Granjon et al., 2016). Algunos autores postulan que los ensayos con múltiples antígenos permiten un mejor análisis del estatus inmunológico del paciente y puede correlacionarse con el nivel de parasitemia en ciertos paciente e indicar el estado de eliminación del parásito (Granjon et al., 2016). Por otro lado, un método de neutralización utilizado en un estudio reciente para resolver los resultados discrepantes mostró una gran especificidad (Flores-Chavez et al., 2018).

1.9. Tratamiento

Desde la década de los 70 sólo existen dos fármacos aprobados para el tratamiento de la EC en humanos, Benznidazol (BNZ) y Nifurtimox (NFX) (Bern et al., 2007). Sin embargo, tanto la seguridad como la eficacia de estos fármacos están lejos de ser las ideales. Dado que la eficacia del tratamiento parece disminuir con el tiempo desde la infección, la detección temprana y una rápida intervención son cruciales (Pérez-Molina y Molina, 2017). En la fase aguda y en niños menores de 12 meses se estiman cifras de curación cercanas al 100% tras el tratamiento con BNZ mientras que en la fase crónica de la enfermedad estas tasas de curación disminuyen (Oliveira et al., 2010; Viotti et al., 2014).

A pesar de que el BNZ puede dar lugar a efectos secundarios gastrointestinales al inicio del tratamiento, las reacciones adversas que más frecuentemente inducen a su abandono son las derivadas de la hipersensibilidad cutánea, con aparición de exantema eritematoso y pruriginoso que en ocasiones puede ser grave. Por su parte las reacciones adversas más frecuentes del NFX (no disponible en España) son la anorexia, los vómitos, las náuseas, y, en menor medida, dolor abdominal, diarrea, pérdida de peso, irritabilidad, somnolencia y alteraciones psiquiátricas. La neuropatía periférica es dosis dependiente y ocurre más frecuentemente durante el segundo mes de tratamiento (Roca Saumell et al., 2015).

La ausencia de un medicamento seguro y totalmente efectivo para el tratamiento de la EC hace necesaria la realización de ensayos con el fin de obtener nuevas alternativas terapéuticas. Las estrategias anti *T. cruzi* se basan mayoritariamente en la modificación

de las moléculas de BNZ NFX con el fin de disminuir su toxicidad y / o aumentar su eficacia tripanocida, o bien en el uso de drogas ya existentes para otras enfermedades. Posaconazol y Ravuconazol, las dos alternativas más prometedoras para el tratamiento de EC, no obtuvieron los resultados esperados en los ensayos clínicos de fase II (Sales Junio et al., 2017). Otra estrategia es la combinación de estos fármacos con los ya existentes (BNZ y NFX) y con otros fármacos tripanocidas (Sales Junio et al., 2017).

1.10. Control

Actualmente no existe vacuna para la EC y aunque los programas de control en el área endémica han centrado la mayoría de sus presupuestos en la eliminación vectorial, los objetivos de control son la eliminación de la transmisión y el acceso temprano a la atención médica para la población infectada. Dependiendo de la zona geográfica, se recomiendan las siguientes estrategias: (i) fumigación de casas y áreas circundantes con insecticidas residuales, (ii) mejora y limpieza de las viviendas para prevenir la infestación del vector, (iii) uso de mosquiteras, (iv) higiene en la preparación, transporte, almacenamiento y consumo de alimentos, (v) cribado en bancos de sangre, (vi) cribado de donantes de órganos, (vii) cribado de la enfermedad congénita tanto en mujeres embarazadas como en recién nacidos de madres infectadas (OMS, 2017).

Por otro lado la globalización de la enfermedad obliga a los países no endémicos a establecer medidas de prevención y control como el cribado de donantes en bancos de sangre, y el seguimiento y tratamiento de los pacientes infectados (OMS, 2007). Con el objetivo de controlar la transmisión en España se han implementado, entre otras medidas, el cribado de EC en donantes de sangre y tejidos procedentes de área

endémica (BOE, 2005), o los programas de prevención de transmisión vertical de algunas Comunidades Autónomas como Cataluña, la Comunidad Valenciana y Galicia (Requena-Méndez et al., 2014).

1.11. Nuevas estrategias de diagnóstico, pronóstico y curación

La seroreversión del título de anticuerpos frente a algunos antígenos del parásito es el único criterio de curación y esto puede tardar en producirse hasta 10-20 años. La aparición de nuevas tecnologías como las “ómicas” permiten el estudio de diferentes biomarcadores que pueden ser de utilidad en el diagnóstico, estudios de progresión y de respuesta terapéutica (Fernandez-Villegas et al., 2016). Estos biomarcadores pueden estar relacionados con el propio parásito o con la respuesta del hospedador a la presencia del parásito (Girones et al., 2001; Pinazo et al., 2015). No obstante la mayoría de estos estudios se encuentran en fases muy preliminares y aún no hay datos científicos consistentes sobre la utilidad de estos biomarcadores en el diagnóstico de la enfermedad (Pinho et al., 2016).

Justificación y Objetivos

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1. Justificación del estudio

No hay técnica considerada *gold-standard* para el diagnóstico de la EC y la OMS sigue recomendando el uso de dos técnicas basadas en principios diferentes y realizadas en paralelo. En ocasiones, esto conduce a la obtención de resultados discordantes que normalmente se resuelven repitiendo las pruebas en una nueva muestra. Cuando los resultados contradictorios se mantienen, la OMS recomienda realizar una técnica de confirmación como el WB. Sin embargo, la mayoría de laboratorios no disponen de técnicas confirmatorias por lo que estos pacientes no alcanzan un diagnóstico definitivo. A día de hoy, se desconocen los motivos de la serodiscordancia persistente, especialmente en pacientes no tratados lo que conlleva a tener que realizar seguimientos clínicos y analíticos en todos ellos.

2.2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es conocer la prevalencia de la serodiscordancia que se detecta en pacientes latinoamericanos fuera de la zona endémica y analizar el rendimiento y valor de dos técnicas confirmatorias basadas en el WB para facilitar el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

Objetivos específicos:

1. Realizar el cribado de la infección por *T. cruzi* a través de dos técnicas serológicas diferentes a inmigrantes latinoamericanos (no caribeños) atendidos en dos

Unidades referentes en Medicina Tropical fuera del área endémica durante un periodo de 4 años.

2. Comparar y evaluar el rendimiento de dos WB, uno comercial, TESA-blot, y otro no comercial, WB-IH, como pruebas confirmatorias en casos con resultados no concluyentes.
3. Analizar las características clínico-epidemiológicas de individuos que obtuvieron resultados serodiscordantes.
4. Evaluar el rendimiento de las dos técnicas utilizadas en el cribado de la infección, un ELISA que emplea antígenos recombinantes y otro que utiliza antígenos nativos, cuando obtienen resultados contradictorios entre ellas.
5. Analizar el seguimiento serológico de los pacientes con resultados no concluyentes en un periodo de 4 años, desde 2014 a 2018.

-

3. RESULTADOS

Los resultados de esta tesis están desarrollados en las siguientes publicaciones:

Capítulo 1:

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 Sep;22(9):788-792. doi: 10.1016/j.cmi.2016.06.001. Epub 2016 Jun 16.

Capítulo 2:

Moure Z, Sulleiro E, Iniesta L, Guillen C, Molina I, Alcover MM, Riera C, Pumarola T, Fisa R. **The challenge of discordant serology in Chagas Disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases.** Acta Trop. 2018 May 15;185:144-148. doi: 10.1016/j.actatropica.2018.05.010

3.1. Capítulo 1: Serodiscordancia en la enfermedad de Chagas crónica: un problema real en países no endémicos.

Título original: *Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries*

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.

Clin Microbiol Infect.2016 Sep; 22(9):788-792

3.1.1 Introducción

El diagnóstico de la EC crónica se basa en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* por dos técnicas serológicas diferentes. En caso de resultados discordantes entre las pruebas la OMS propone realizar una tercera técnica confirmatoria. Hasta el momento no existe una técnica de referencia para la confirmación de EC en pacientes con resultados serológicos repetidamente discordantes.

3.1.2 Objetivos

Los objetivos principales de este estudio fueron: i) conocer la prevalencia de la serodiscordancia en el cribado de la infección por *T. cruzi* en dos países fuera del área endémica y ii) evaluar el rendimiento del WB comercial TESA-blot, como prueba confirmatoria en: a) un grupo de pacientes con resultados inicialmente discordantes a los que no se les pudo repetir la serología y b) en un grupo de pacientes con resultados repetidamente discordantes (no-concluyentes). Los objetivos secundarios fueron: analizar las características clínico-epidemiológicas en ambos grupos de pacientes y

establecer la concordancia de las técnicas de cribado utilizadas con respecto a la prueba confirmatoria TESA-blot.

3.1.3 Material y Métodos

Se trata de un estudio observacional y retrospectivo llevado a cabo en el Departamento de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH) y en el Centro de Enfermedades Tropicales, Hospital Sacro Cuore (CTD), Negrar, Italia de Enero de 2010 a Diciembre de 2014. Se cribó la infección por *T. cruzi* a todos los inmigrantes latinoamericanos atendidos en ambas Unidades que accedieron a la realización de las pruebas. Se realizaron simultáneamente dos técnicas ELISA: una basada en antígenos recombinantes (r-ELISA) y otra en antígenos nativos (n-ELISA). En caso de resultados discordantes, se repitió la serología en una nueva muestra a los 4- 6 meses y si los resultados eran repetidamente discordantes se consideraron no-concluyentes. El WB, TESA-blot se realizó en todos los sueros con resultados no-concluyentes y en los sueros mejor caracterizados con resultados inicialmente discordantes en los que no se pudo repetir la serología en nueva muestra.

3.1.4 Resultados

De un total de 4.939 de individuos cribados, 1.124 (22,7%) obtuvieron resultados positivos y 165 (3,3%) resultados inicialmente discordantes. Las pruebas serológicas se repitieron en una nueva muestra a los 4-6 meses en 88/165 casos y las discrepancias se resolvieron en 25/88 (28,4%) de ellos. Los pacientes sin un diagnóstico definitivo fueron clasificados en dos grupos diferentes:

- Grupo 1: pacientes con resultados repetidamente discordantes (no-concluyentes) en más de una muestra ($n = 63$).
- Grupo 2: pacientes con resultados inicialmente discordantes en los que no fue posible repetir los test serológicos en una nueva muestra ($n = 77$).

El TESA-blot fue realizado en todos los individuos del Grupo 1 y en 39/77 del Grupo 2 resultando positivo en 33/63 (52,4%) y en 21/39 (53,8%), respectivamente. Dentro del Grupo 1, 3 sujetos con resultados positivos por TESA-blot presentaron alteraciones viscerales, mientras que ningún individuo con resultados confirmatorios negativos presentó alteraciones. El ELISA basado en antígenos nativos mostró una concordancia moderada con el TESA-blot ($k = 0,53$), mientras que el ELISA basado en antígenos recombinantes mostró un claro desacuerdo con esta técnica confirmatoria ($k < 0$).



Contents lists available at ScienceDirect

Clinical Microbiology and Infection

journal homepage: www.clinicalmicrobiologyandinfection.com

Original article

Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries

Z. Moure^{1,*}, A. Angheben^{2,3}, I. Molina⁴, F. Gobbi^{2,3}, M. Espasa¹, M. Anselmi⁵, F. Salvador⁴, S. Tais⁶, A. Sánchez-Montalvá⁴, T. Pumarola¹, P. Albajar-Viñas⁷, E. Sulleiro¹¹ Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS, Barcelona, Spain² Centre for Tropical Diseases, Hospital 'Sacro Cuore—Don Calabria', Negrar, Italy³ Global Health Centre of Tuscany Region, Florence, Italy⁴ Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS, Barcelona, Spain⁵ Centro de Epidemiología Comunitaria y Medicina Tropical, Esmeraldas, Ecuador⁶ Service of Epidemiology and Laboratory for Tropical Diseases, Hospital 'Sacro Cuore—Don Calabria', Negrar, Italy⁷ Department of HIV/AIDS, Tuberculosis, Malaria and Neglected Diseases, Control of Neglected Tropical Diseases Department, WHO, Geneva, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 February 2016

Received in revised form

2 June 2016

Accepted 6 June 2016

Available online 16 June 2016

Editor: E. Bottieau

Keywords:

Chagas

Chronic

Inconclusive

Non-endemic

Serology

ABSTRACT

According to the WHO, chronic Chagas disease (CD) diagnosis is based on two serological techniques. To establish a definitive diagnosis, the results must be concordant. In cases of discordances, the WHO proposes repeating serology in a new sample, and if results remain inconclusive, a confirmatory test should be performed. This study, conducted at two Tropical Medicine Units in Europe over 4 years, aims to assess the diagnostic yield of TESA- (trypomastigote excreted–secreted antigens) blot as a confirmatory technique in patients with inconclusive and discordant results. Of 4939 individuals screened, 1124 (22.7%) obtained positive results and 165 (3.3%) discordant results. Serology was repeated in 88/165 sera and discrepancies were solved in 25/88 (28.4%) cases. Patients without a definitive diagnosis were classified in two different groups: Group 1, including patients with inconclusive results despite retesting ($n = 63$), and Group 2, including patients with discordant results not retested ($n = 77$). TESA-blot was performed for all of Group 1 and 39/77 of Group 2 and was positive for 33/63 (52.4%) and 21/39 (53.8%), respectively. Analysis of Group 1 results showed a moderate agreement between results of the ELISA based on native antigen and TESA-blot ($\kappa 0.53$). In contrast, a clear disagreement was observed between the ELISA based on recombinant antigens and TESA-blot ($\kappa < 0$). A sizeable proportion of patients are suspected to have CD with inconclusive results or in whom re-testing is not feasible. TESA-blot was positive in half of these patients, highlighting the need for a confirmatory assay in European centres caring for exposed individuals. **Z. Moure, CMI 2016;22:788**

© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Chagas disease (CD) is a zoonotic infection caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. CD is endemic in continental Latin America, where an estimated 6–7 million people are infected, and nearly 60 million people are at risk of infection [1,2]. Moreover, in recent decades CD has become a global issue as a consequence of increased migration from endemic to non-endemic areas [3,4].

Spain, followed by Italy, receives the most Latin American immigrants in Europe [5,6].

CD diagnostics depend on the phase of infection. In acute phase, the best diagnostic strategy relies on direct parasitological techniques and, recently, on PCR. The chronic indeterminate phase is characterized by low or undetectable parasitaemia and parasitological examinations, even PCR, are often useless. According to the WHO, chronic CD diagnosis is based on detection of anti-*T. cruzi* antibodies by two different serological techniques performed in parallel, unless a highly sensitive and specific technique becomes available for use alone [7]. Indirect immunofluorescence, ELISA, or haemagglutination assay are usually recommended [7–9].

* Corresponding author. Z. Moure, Vall d'Hebron University Hospital, Microbiology Department, P. de la Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.

E-mail address: zmoure@vhebron.net (Z. Moure).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2016.06.001>

1198-743X/© 2016 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

To establish a definitive diagnosis, the results of both techniques must be concordant. In cases of discordance, the WHO proposes repeating serology using a new serum sample, and if results remain inconclusive a confirmatory test such as PCR or Western blotting should be performed. However, CD PCR is highly variable in its limit of detection, which depends on the presence of the parasite in blood and is currently not considered efficient for diagnosing chronic CD [7,10,11]. The commercial Western blot, TESA-blot (Biomérieux, RJ, Brasil), is an immunoblotting assay that uses secreted and excreted trypomastigote antigens. TESA-blot has sensitivity and specificity values close to 100% and is considered an excellent serological confirmatory test [12,13].

We present a study on discordant cases of CD seen during a 4-year period at two reference Tropical Medicine Units in Europe. This study aims to assess the diagnostic yield of TESA-blot as a confirmatory technique in patients with inconclusive and discordant results.

Materials and methods

This is a retrospective observational study performed at Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Barcelona, Spain, and Centre for Tropical Diseases, Sacro Cuore Hospital (CTD), Negrar, Italy from January 2010 to December 2014. CD disease screening was performed in all adult non-Caribbean Latin-American individuals who attended at the two centres during this period and accepted.

To analyse patients without a definitive diagnosis, the inclusion criteria were: adults >18 years old with at least one discordant *T. cruzi* serology, no co-morbidities conditioning immunosuppression, and no previous specific trypanocidal treatment. Clinical and epidemiological data were collected when available: age, gender, country of origin and visceral involvement. Cardiac involvement was assessed by 12-lead electrocardiogram and chest X-ray, and gastrointestinal involvement was assessed through oesophagogram and barium enema. The study protocol was approved by the ethical review boards of both hospitals.

Serological diagnosis

Serum samples were tested by two ELISAs simultaneously, one based on a recombinant antigen (r-ELISA), and the other on a native antigen (n-ELISA). The commercial kit Bioelisa Chagas (Biokit, Lliça d'Amunt, Spain) for r-ELISA was used in both laboratories. In relation to the native antigen, EIA ORTHO *T. cruzi* ELISA Test System (Johnson and Johnson, New Brunswick, NJ, USA) was carried out at the HUVH, and ELISA Chagas III Test (BiosChile, Santiago, Chile) was performed at the CTD. All screening tests used in the study have a reported sensitivity and specificity close to 100% [14,15].

Results were expressed as the index between the absorbance of the test serum and the threshold value. Tests were considered negative if the index was <0.9, equivocal if ≥ 0.9 and < 1, and positive if ≥ 1 . In case of discordant results, serology was repeated using a new sample at 4–6 months whenever possible. If results remained discordant, they were finally considered inconclusive.

RT-PCR

When possible, *T. cruzi* real-time PCR was performed in guanidine hydrochloride pre-treated blood samples of patients with inconclusive results as described elsewhere [16]. All of the samples were analysed in duplicate and considered valid when the internal control was amplified. Results were positive when at least one of the two cycle thresholds (Ct) for the *T. cruzi* target was <40.

Immunoblotting

The commercial Western blot test, TESA-blot, with reported sensitivity and specificity values close to 100%, was performed for all inconclusive results, and the best-studied discordant sera as previously described [12,17]. The presence of bands in the 120- to 200-kDa molecular mass region indicated a positive result and the absence of such bands indicated a negative result.

Due to the cross-reactivity of chagasic sera with other organisms, mainly with *Leishmania* spp., three serum samples from patients infected with the latter organism were tested by TESA-blot. Three sera from confirmed chagasic patients were used as positive controls and three parasite-negative sera were used as negative controls.

Statistical analysis

SPSS v17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. Categorical data are presented as absolute numbers and proportions, and continuous variables are expressed in terms of means and ranges or 95% CI. Chi-square test, with Fisher correction if necessary, was used for discrete variables and the Student's *t* test was used for continuous variables when required. The correlation between results of TESA-blot with those of r-ELISA and with n-ELISA was assessed using a κ coefficient.

Results

During the study period, 4939 Latin American immigrants were screened for CD in both centres (2629 from CTD and 2310 patients from HUVH). Initially, 22.7% (1124/4939) of patients were confirmed as being infected with *T. cruzi* as both tests performed at each hospital were positive. A total of 73.9% (3650/4939) of patients had negative diagnoses, and 3.3% (165/4939) had initially discordant results. It was possible to repeat serology in 88 of this subgroup of patients and discrepancies were resolved in 25/88 (28.4%) cases (seven were confirmed positive and 18 negative). Finally, we classified patients without a definitive screening diagnosis for CD into two groups:

- Group 1: patients with inconclusive results despite repeating serology using a new sample ($n = 63$).
- Group 2: patients with discordant results in whom it was not possible to repeat serology using a new sample ($n = 77$).

Epidemiological, clinical, and analytical data of Group 1 and Group 2 are summarized in Table 1.

Information about the index values of the ELISAs was available only for the Spanish cohort of infected patients ($n = 616$; r-ELISA index mean 4.78 ± 2.21 , n-ELISA index mean 4.76 ± 1.65). When comparing ELISA indices of Group 1 and Group 2, each, with ELISA indices of the infected cohort, significant differences were found for both groups ($p < 0.0001$).

All sera from patients with inconclusive results (Group 1) were tested by TESA-blot. The test was positive in 33 (52.4%) and negative in 30 (47.6%) of the 63 samples.

Regarding patients with discordant results (Group 2), TESA-blot was performed in 39/77 individuals. The test was positive in 21/39 (53.8%) and negative in 18/39 (46.2%) of the samples.

Following the WHO algorithm, our results are presented in Fig. 1.

When we analysed TESA-blot-positive and -negative groups in Group 1, patients of Bolivian origin were significantly higher in the first group ($p 0.003$); however, no significant differences in relation to age or gender were found between the two groups.

Among the TESA-blot-positive group, cardiac and gastrointestinal assessment was performed in 19/33 and 15/33 patients, respectively. One patient (5.2%) had cardiac alterations and two (13.3%) had gastrointestinal abnormalities. Among the TESA-blot-negative group, cardiac and gastrointestinal assessment was performed in 10/30 and 1/30 cases, respectively, and none presented alterations.

When we compared ELISA index values, the mean of the n-ELISA index was significantly higher in the TESA-blot-positive group (1.31 ± 0.83) than in the negative group (0.45 ± 0.32) ($p < 0.0001$). In contrast, the mean of the r-ELISA index was significantly higher in the TESA-blot-negative group (2.29 ± 1.53) than in the positive group (1.36 ± 1.48) ($p 0.02$).

Comparing TESA-blot and n-ELISA tests, a moderate agreement ($\kappa 0.53$, 95% CI 0.32–0.74) was found. In contrast, a clear disagreement was observed between the ELISA based on the recombinant antigen and TESA-blot ($\kappa < 0$).

Real-time PCR was performed for 31/63 of the patients with inconclusive results. Of these, 48.3% (15/31) obtained TESA-blot and PCR concordant results, 14 were negative, and one patient was positive by both techniques confirming the disease.

Epidemiological, clinical and analytical data of patients with TESA-blot results are summarized in Table 2.

Discussion

In the 4-year study period, a total of 4939 Latin American migrants attending HUVH and CTD were screened for CD. We detected 1124 positive cases, representing a prevalence of 22.7%, which is in agreement with other studies conducted in Europe [18,19]. In contrast, a study carried-out in 15 European countries, excluding Spain, showed much lower prevalence rates [20]. Both hospitals from this study, located in Italy and Spain, are considered reference centres for CD. Hence, a 'selection' bias could contribute to the high proportion of positive results found in our study. Moreover, the high proportion of Bolivians in our cohort may explain the high rate of seropositivity, based on results from previous studies performed only in Bolivians in Spain and Italy [6,21,22].

In our study, we detected a non-negligible prevalence of initially discordant results (3.3%). According to the WHO, discordant results can be reduced to 2% using three serological tests in parallel [7,23]. Authors in endemic areas had found 2.9% and 2% of discordances in blood banks and chronic chagasic patients, respectively [10,24].

We have analysed separately individuals with inconclusive and discordant serology, and no significant differences were observed regarding epidemiological, and clinical and analytical data. However, comparing clinical characteristics of each group with a confirmed Chagas-affected cohort previously described by Salvador et al [25], it is notable that cardiac involvement was lower in our

group of patients with inconclusive results (Group 1), which can be explained by the fact that around half of this group are not real CD cases, but false-positive results for one of the ELISAs. In contrast, in the group of patients with discordant serology in our study (Group 2), there was a greater percentage of cardiac involvement, which suggests that these individuals might be truly positive for infection [25].

Sensitivity of serological techniques for CD diagnosis may vary depending on several factors, such as the infecting parasite strain or host immune response [26]. Furthermore, in patients who are co-infected with other pathogens, especially *Leishmania* spp., the possibility of cross-reactivity reduces specificity of serological results [27].

Although such problems are usually solved by repeating the tests using new samples, according to the WHO when repeated serological results are inconclusive, a third test such as PCR or Western blotting should be performed [7]. Yet, CD PCR is highly variable and should not be used for confirmation of chronic CD [11]. Although a positive PCR result confirms CD diagnosis, a negative result does not disprove infection.

On the other hand, Western blotting can recognize a combination of different antigenic fractions of the parasite, but it is an expensive, laborious technique requiring qualified technician staff.

Until now, there was no commercial technology available in Europe to provide an accurate, definitive CD diagnosis for patients with discordant serological results.

Several studies claimed that TESA-blot can be used as a confirmatory commercial test with high sensitivity and specificity [12,28,29]. When TESA-blot was performed in an endemic area in Bolivia, sensitivity and specificity were close to 100% [30].

In our study, TESA-blot was positive for more than half of both inconclusive and discordant sera tested. A study conducted in a Brazilian blood bank found that 2.87% of samples were CD-positive by confirmatory TESA-blot [26]. This sizeable difference is probably the consequence of different populations assessed and different serological techniques used.

Regarding patients with inconclusive serology, we found visceral abnormalities in those who obtained TESA-blot-positive results, which reinforces the fact that these patients are truly infected. For ethical reasons trypanocidal treatment was offered to all TESA-blot-positive patients.

A higher concordance between TESA-blot and n-ELISA than with r-ELISA was observed in this study. This finding could be explained by the fact that these two techniques are based on native antigens of *T. cruzi* detection, although the respective antigens are from different phases of the parasite's life cycle. TESA-blot has the advantage of using antigens of the trypomastigote form, which is found in the human infection cycle, and should therefore be more specific.

Table 1
Epidemiological, clinical and analytical data of Group 1 (inconclusive patients) and Group 2 (discordant patients)

Characteristics	Inconclusive patients Group 1 (n = 63)	Discordant patients Group 2 (n = 77)	p value
Female sex	46/63 (73%)	50/77 (64.9%)	0.30
Age (years)	36.5 (20–75)	37.5 (21–56)	0.56
Country of origin	Bolivia, 56/63 (88.9%)	Bolivia, 67/77 (87%)	0.73
Cardiac abnormalities	1/29 (3.4%)	3/16 (18.7%)	NA
Gastrointestinal abnormalities	2/16 (12.5%)	2/15 (13.3%)	NA
Screening serology			
r-ELISA index value	1.8 (95% CI 1.41–2.18)	2.12 (95% CI 1.67–2.57)	0.30
n-ELISA index value	0.90 (95% CI 0.71–1.09)	0.78 (95% CI 0.66–0.90)	0.27
Positive r-ELISA/negative n-ELISA results	41/63 (65.1%)	52/77 (67.5%)	0.76
Negative r-ELISA/positive n-ELISA results	22/63 (34.9%)	25/77 (32.5%)	0.76

Data are reported as number (%) of patients, mean (range) or mean (95% CI).

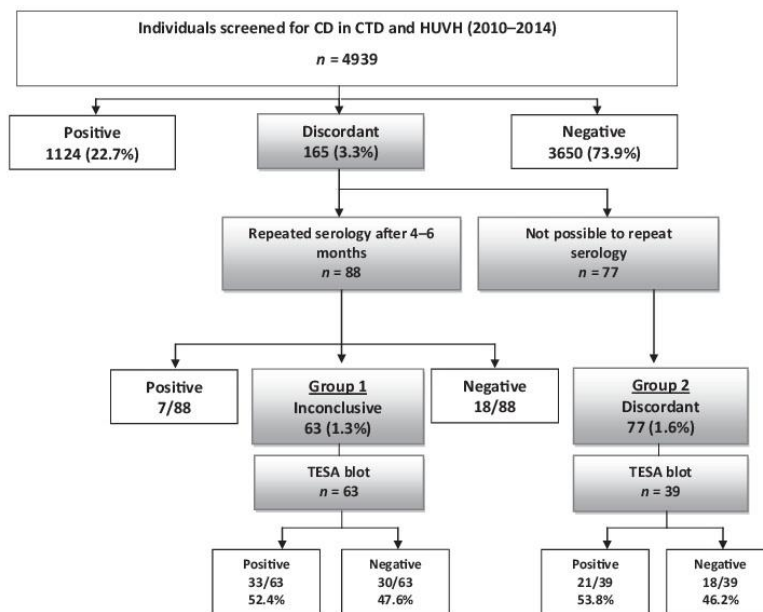


Fig. 1. WHO algorithm applied to our cohort of patients.

Table 2
Epidemiological, clinical and analytical data of inconclusive patients with TESA-blot results

Characteristics	Group 1: Inconclusive patients n = 63		p value
	TESA-blot positive patients; n = 33	TESA-blot negative patients; n = 30	
Female sex	23/33 (69.7%)	23/30 (76.6%)	0.53
Age (years)	37.4 (20–52)	35.6 (18–75)	0.51
Country of origin	Bolivia, 33/33 (100 %)	Bolivia, 23/30 (76.7%)	0.003
Cardiac abnormalities	1/19 (5.2%)	0/10 (0%)	NA
Gastrointestinal abnormalities	2/15 (13.3%)	0/1 (0%)	NA
r-ELISA index value	1.36 (95% CI 0.85–1.86)	2.29 (95% CI 1.74–2.84)	0.02
n-ELISA index value	1.31 (95% CI 1.03–1.59)	0.45 (95% CI 0.33–0.56)	<0.0001
Positive PCR	1/17 (5.9%)	0/14 (0%)	NA

NA, not applicable: the sample size was not large enough to be considered statistically significant. Data are reported as number (%) of patients, mean (range) or mean (95% CI).

The n-ELISA indices were significantly higher in TESA-blot-positive patients, which is consistent with the observed concordance between these tests. On the other hand, r-ELISA indices were higher in individuals with TESA-blot-negative results, which suggests that more false-positive results were obtained from r-ELISA.

According to our results, approximately 30% of initially discordant samples would be resolved by repeating serology using a new sample. However, it is worth mentioning the practical difficulty in re-testing samples in clinical routine, especially for non-endemic countries. Furthermore, in our study, it was not possible to repeat serology for all patients with initially discordant results due to loss of follow up, and we could only perform TESA-blot in 39 out of 77 of these individuals. Hence, we have not analysed TESA-blot-positive and -negative populations in this group because the small sample size used might introduce bias.

Without the use of a confirmatory test, over half of the affected patients with inconclusive and discordant results would be misdiagnosed. Failure to diagnose these patients would result in a lack of treatment that increases the risk of complications [25]. On the

other hand, patients with negative TESA-blot results should be declared free of disease and clinical follow up would not be necessary, resulting in health-system cost-savings.

A limitation of our study is that it is retrospective, and we had better detailed demographics and clinical data only for patients with discordant and inconclusive results and not for all of the patients screened. Additionally, one of the two commercial screening techniques performed was not the same in both hospitals (native antigens ELISA, n-ELISA). Finally, it was not possible to perform TESA-blot in all discordant sera, as the test is not available in Europe.

Conclusion

Our study, carried out in tropical disease reference centres in non-endemic areas, showed a considerable seroprevalence of CD in the screened population. There is a sizeable proportion of patients suspected of CD with inconclusive results or discordant results in whom re-testing is not feasible. TESA-blot was positive for *T. cruzi*

infection for half of these patients, highlighting the need of such a confirmatory assay in European centres taking care of exposed individuals.

Transparency declaration

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

[1] WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. Geneva: World Health Organization. Available at: <http://www.who.int/entity/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>.

[2] Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2007. Available at: http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/trDR_SWG_09_spa.pdf.

[3] Lescure F-X, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010;10:556–70.

[4] [Internet] Statement – Chagas disease in Europe. Recommendations of an informal consultation meeting on Chagas disease control and prevention in Europe. Geneva: World Health Organization; 2009. Available at: http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_chagas_statement/en/.

[5] Emody Levente. Chagas disease, update on a migration related tropical disease in Europe [Internet]. World Health Organization; 2014 [cited 2015 Mar 11]. Available at: http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0020/253406/PHAME-2nd-issue-Overview.pdf.

[6] Angheben A, Anselmi M, Gobbi F, Marocco S, Monteiro G, Buonfrate D, et al. Chagas disease in Italy: breaking an epidemiological silence. *Chagas Dis Eur [Internet]* 2011;6 [cited 2015 Aug 31]. Available from: <http://www.eurosurveillance.eu/images/dynamic/ES/V14N01/V14N01.pdf#page=8>.

[7] [Internet] Control of Chagas disease second report of a WHO expert committee. Geneva: World Health Organization; 2002. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10040305>.

[8] Longo DL, Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med [Internet]* 2015 Jul 30;373(5):456–66 [cited 2015 Aug 4]. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra1410150>.

[9] Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis [Internet]* 2015 Jul [cited 2015 Aug 4]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1473309915002431>.

[10] Lapa JS, Saraiva RM, Hasslocher-Moreno AM, Georg I, Souza AS, Xavier SS, et al. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]* 2012 Jun;31(6):965–74 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10096-011-1393-9>.

[11] Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis [Internet]* 2010;10(1):337 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/337>.

[12] Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J Clin Microbiol [Internet]* 1996;34(9):2143–7 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://jcm.asm.org/content/34/9/2143.short>.

[13] Furuchó CR, Umezawa ES, Almeida I, Freitas VL, Bezerra R, Nunes EV, et al. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop Med Int Health [Internet]* 2008 Dec;13(12):1527–33 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3156.2008.02172.x>.

[14] Flores-Chavez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. [Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain]. *Enferm Infecc Microbiol Clin [Internet]* 2010;28(5):284–93 [cited 2016 Apr 24]. Available from: <http://europemc.org/abstract/med/19962790>.

[15] Díaz RHE. Diagnóstico de Chagas por ELISA. Comparación entre ensayos comerciales producidos por tecnología tradicional y tecnología recombinante [Internet]. Poster presented at: Congreso de Parasitología, Chile. 2003 [cited 2016 Apr 25]. Available from: http://www.chagas.cl/4_publicaciones/pdf/congreso_parasitologia_2003.pdf.

[16] Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007 Sep;103(3):195–200.

[17] Umezawa ES, Bastos SF, Coura JR, Levin MJ, Gonzalez A, Rangel-Aldao R, et al. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion (Paris)* 2003 Jan;43(1):91–7.

[18] Ramos JM, Ponce Y, Gallegos I, Flores-Chávez M, Cañavate C, Gutiérrez F. *Trypanosoma cruzi* infection in Elche (Spain): comparison of the seroprevalence in immigrants from Paraguay and Bolivia. *Pathog Glob Health [Internet]* 2012 May;106(2):102–6 [cited 2015 Aug 28]. Available from: <http://www.maneyonline.com/doi/abs/10.1179/2047773212Y.0000000013>.

[19] Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardín A, et al. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4(2):e592.

[20] Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010 Aug;115(1–2):14–21.

[21] Paricio-Talayero JM, Benloch-Muncharaz MJ, Collar-del-Castillo JL, Rubio-Soriano A, Serrat-Pérez C, Magraner-Egea J, et al. [Epidemiological surveillance of vertically-transmitted Chagas disease at three maternity hospitals in the Valencian Community]. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica* 2008 Dec;26(10):609–13.

[22] Muñoz J, Gómez i Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chejade P, et al. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 2009 Jul;111(1):51–5.

[23] Consultation on international biological reference preparations for Chagas diagnostic tests [Internet]. World Health Organization; 2007. Available from: http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/WHO_Report_1st_Chagas_BRP_consultation_7-2007_final.pdf?ua=1.

[24] Carvalho MR, Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Shikanai-Yassuda MA, Ferreira AW, et al. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion (Paris)* 1993 Oct;33(10):830–4.

[25] Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezas J, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. *Clin Microbiol Infect [Internet]* 2014 Jul;20(7):706–12 [cited 2015 Aug 27]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X14611630>.

[26] Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, et al. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang [Internet]* 2004;87(3):204–7 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1423-0410.2004.00571.x/full>.

[27] Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gallego M, Tebar S, et al. Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg [Internet]* 2012 Mar 1;86(3):412–6 [cited 2015 Mar 9]. Available from: <http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.2012.11-0111>.

[28] Amato Neto V, De Marchi CR, Ferreira CS, Ferreira AW. [Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005 Dec;38(6):534–5.

[29] Picka MCM, Meira DA, de Carvalho TB, Peresi E, Marcondes-Machado J. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz J Infect Dis [Internet]* 2007;11(2):226–33 [cited 2015 Mar 3]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-86702007000200012&script=sci_arttext.

[30] Zarate-Blades CR, Bladés N, Nascimento MS, da Silveira JF, Umezawa ES. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted–secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Diagn Microbiol Infect Dis [Internet]* 2007 Feb;57(2):229–32 [cited 2015 Mar 3]. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S073288930600294X>.

3.2 Capítulo 2: El reto de la serología discordante en enfermedad de Chagas: el papel de dos técnicas confirmatorias en casos no concluyentes

Título original: The challenge of discordant serology in Chagas disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases.

Moure Z, Sulleiro E, Iniesta L, Guillen C, Molina I, Alcover MM, Riera C, Pumarola T, Fisa R.

Acta Trop. 2018 May 15;185:144-148.

3.2.1 Introducción

La discordancia serológica en la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* sigue siendo un desafío diagnóstico ya que el manejo de los individuos con resultados no concluyentes resulta complejo. El papel de las técnicas de cribado cuando los resultados son discordantes se desconoce así como el comportamiento de los niveles de anticuerpos en este grupo de individuos a lo largo del tiempo.

3.2.2 Objetivos

Los objetivos principales de este trabajo fueron: (i) comparar dos técnicas confirmatorias, en la resolución de casos con resultados no-concluyentes en el diagnóstico de la EC, (ii) analizar el rendimiento de las técnicas de cribado en este grupo de individuos en referencia a los resultados confirmatorios (iii) describir los

resultados serológicos de estos sujetos a lo largo de un periodo de seguimiento de 4 años.

3.2.2 Material y Métodos

Se incluyeron 48 sueros con resultados serológicos repetidamente discordantes de 48 pacientes latinoamericanos cribados durante el periodo 2010-2014. El cribado de EC se realizó mediante dos técnicas serológicas diferentes siguiendo las recomendaciones actuales de la OMS: una basada en antígenos recombinantes BioELISA Chagas; Biokit® S.A. (r-ELISA), y otra basada en antígenos nativos Ortho® T. cruzi Elisa Test System (n-ELISA). Para su confirmación todos los sueros fueron analizados por dos WB: un WB *in-house* (WB-IH) que usa un lisado de epimastigotes de *T. cruzi* (cepa Maracay); y un WB comercial, TESA-blot, que utiliza antígenos de excreción-secreción de la forma tripomastigote de *T. cruzi*. Asimismo, durante el periodo 2014-2018 se realizó una recogida de datos de seguimiento serológico de los pacientes.

3.2.4 Resultados

De los 48 sueros estudiados, TESA-blot confirmó la infección en 22 (45,8%) casos y el IH-WB en 17 (35,4%). Ambas técnicas mostraron una buena concordancia ($k = 0.604$). En 24/48 (50%) sueros se pudo llegar a un resultado definitivo definido por la positividad de uno de los ELISA y al menos una de las pruebas confirmatorias. Se observó una concordancia moderada del n-ELISA con ambos WB ($k = 0,44$ con TESA-blot y $k = 0,56$ con IH-WB) y una menor dispersión de sus valores índice. El r-ELISA además de presentar un claro desacuerdo con ambas técnicas confirmatorias, mostró una gran dispersión en sus valores índice, especialmente en los grupos de confirmados

negativos. La mayoría de los individuos mantuvieron resultados serológicos discordantes con valores próximos al *cut-off* a lo largo del periodo de seguimiento.



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

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

The challenge of discordant serology in Chagas disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases

Zaira Moure^a, Elena Sulleiro^{a,*}, Laura Iniesta^b, Carmen Guillen^b, Israel Molina^c,
M. Magdalena Alcover^b, Cristina Riera^b, Tomás Pumarola^a, Roser Fisa^b

^a Microbiology Department, Vall d'Hebron University Hospital (HUVH), Autonomous University of Barcelona, PROSICS, Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129, 08035, Barcelona, Spain

^b Parasitology Section Department of Biology, Healthcare and Environment, Faculty of Pharmacy and Food Science, University of Barcelona, Av. de Joan XXIII, 27-31, 08028, Barcelona, Spain

^c Infectious Diseases Department, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS, Passeig de la Vall d'Hebron, 119-129, 08035, Barcelona, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:
Chagas disease
Confirmatory
Serodiscordant
Inconclusive
Follow-up

ABSTRACT

Serodiscordance in Chagas disease (CD) remains a challenge since individuals with inconclusive results are clinically complicated to manage. This work, conducted outside the endemic area, aims to compare two different confirmatory techniques for the diagnosis of CD in individuals without a definitive diagnosis, to analyze the performance of the screening techniques in this group of patients, and to describe the serological follow-up of these subjects over time.

Sera from 48 individuals with repeatedly discordant results by one recombinant enzyme immunoassay (r-ELISA) and one native ELISA (n-ELISA), were included in the study. Confirmatory procedures were performed through TESA-blot, using trypomastigote antigens of *Trypanosoma cruzi*, and in-house WB (IH-WB) using a lysate from *T. cruzi* epimastigotes.

Of the 48 sera, TESA-blot confirmed 22 (45.8%) cases and IH-WB 17 (35.4%). Both techniques showed a substantial agreement ($k = 0.604$). Confirmation defined as the positivity of one of the ELISA and at least one of the confirmatory tests was reached in 24/48 (50%) cases. We found a great dispersion of r-ELISA index values, especially among individuals with confirmatory negative results, ranging from 0.03–6.2. Additionally, n-ELISA yielded a better performance than r-ELISA in this cohort of patients, showing a significantly greater agreement with the confirmatory methods.

Our results indicate that either confirmatory test could be an efficient tool to solve inconclusive cases regardless of which form of the parasite's life cycle they use. Also, most individuals remain with discordant serology throughout the short-term follow-up period time of study. Finally, we consider that it is necessary to establish a reference test feasible and commercialized in all areas to solve the problem of inconclusive results.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is a vector-borne disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and an estimated 6–7 million people are infected worldwide (WHO, 2017). Although endemic to Latin America, in the last decades CD has become a global issue as a consequence of the increasing migration movements (Lescure et al., 2010; Statement– and Chagas disease in Europe, 2009).

During the acute phase of the infection, direct methods are the main diagnostic tools used for the detection of *T. cruzi*. Nevertheless, these approaches show low sensitivity during the chronic form of infection, and serological techniques are the most efficient tools for diagnosis in

this phase (Chang et al., 2006).

Although some authors have suggested the use of a single assay for the diagnosis of the chronic phase, the World Health Organization (WHO) still recommends using two serological tests based on different principles performed in parallel (Abrás et al., 2016; Afonso et al., 2012; World Health Organization, 2002). In case of discordant results, serological examination must be repeated in a new sample, and if results remain inconclusive a confirmatory test should be performed (World Health Organization, 2002; Lapa et al., 2012).

WB has the advantage, over other serological techniques, that allows identifying antibodies against different polypeptide fractions of parasite antigens showing a specific band pattern and a lower

* Corresponding author at: Vall d'Hebron University Hospital, Microbiology Department, P. de la Vall d'Hebron 119-129, 08035, Barcelona, Spain.
E-mail address: elena_sulleiro@outlook.es (E. Sulleiro).

<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.05.010>

Received 2 February 2018; Received in revised form 10 May 2018; Accepted 13 May 2018

Available online 15 May 2018

0001-706X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

probability of cross-reactions (Riera et al., 2012).

Among WBs, TESA-blot (Biomerieux, RJ, Brasil), a commercial assay using secreted and excreted trypomastigote antigens, is considered an excellent confirmatory technique with sensitivity and specificity reported rates close to 100% (Umezawa et al., 1996; Furuchó et al., 2008; Amato Neto et al., 2005). Also, the in-house WB (IH-WB) developed by Riera et al. using a total extract of epimastigote form of *T. cruzi*, has been claimed as an efficient alternative method for the diagnosis and confirmation of chronic CD reaching sensitivity and specificity values of 100% (Riera et al., 2012).

The purpose of this work is to compare the performance of two confirmatory techniques, TESA-blot and IH-WB, using different parasite stage, in the diagnosis of CD in individuals with inconclusive serological results. The study also intends to analyze the dispersion of the screening techniques in this group of individuals, as well as to describe the serological follow-up of these subjects over time.

2. Materials and methods

2.1. Study design and samples

This is a retrospective study conducted at the Microbiology Department of Vall d’Hebron University Hospital, Barcelona, Spain, and the Faculty of Pharmacy and Food Sciences, University of Barcelona. Discordant sera from 48 individuals screened during the 2010–2014 period, were included in the study. Inclusion criteria were: adults over 18 years old, with persistently discordant results (at least two discordant serology results at different times), no comorbidities conditioning immunosuppression, and no previous specific trypanocidal treatment. These individuals were classified as individuals with inconclusive serology and clinical and epidemiological data were collected: age, gender, country of origin, and visceral involvement assessed as described before (Moure et al., 2016). Additionally, serological follow-up information of individuals was collected from 2014–2018, when available.

2.2. Screening techniques: enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

We used two different commercial ELISA diagnostic kits: a recombinant enzyme immunoassay (r-ELISA), BioELISA Chagas (Biokit® S.A., Spain), using a fusion protein of the *T. cruzi* epimastigote that comprises four serologically active peptides (PEP-II, TcD, TEC and TcLoE1.2.), and a native enzyme immunoassay (n-ELISA), ORTHO *T. cruzi* ELISA Test System (Johnson and Johnson, USA), based on antigens using a whole-cell lysate of *T. cruzi* epimastigote. Sensitivity and specificity rates of 100% and 97.4%–99.5% respectively for r-ELISA and, 96.6–100% and 99.9% for n-ELISA have been reported (Flores-Chavez et al., 2010; Gorlin et al., 2008). The two tests were performed simultaneously according to the manufacturers’ instructions. Cut-off value (CO) of each run was the product of the mean calibrator optical density (DC) and calibration factor given in each kit. Results given in terms of Index value (IV) (ratio of sample DC/CO) < 0.9 were considered negative, ≥ 1 was considered positive, and the gray zone was from ≥ 0.9 to < 1 for both techniques.

2.3. Confirmatory techniques: western blotting

TESA-blot (Biomerieux, RJ, Brasil), only commercialized in Latin America, was performed as previously described (Umezawa et al., 1996; Umezawa et al., 2003). This test uses *T. cruzi*, trypomastigote excreted-secreted antigens. The presence of bands in the 120-to-200 kDa molecular mass region on the strips indicated a positive result and the absence of such bands showed a negative result. For low or doubtful reactions, the result was considered indeterminate.

The IH-WB using a crude antigen of *T. cruzi* epimastigotes (Maracay strain) was performed according to Riera et al. (2012). A serum sample

was considered positive when at least five antigenic bands of the standard pattern (28, 32, 38, 39, 40 and 48 kDa) were detected, indeterminate when one to four bands were detected and negative when no band was present.

Sera from infected patients and sera from uninfected individuals were included as positive and negative controls in each set of confirmed techniques performed.

2.4. Confirmed infection definition

In the absence of a gold-standard confirmation technique in Europe, infection was defined as the positivity of one ELISA and at least one confirmatory test.

2.5. Statistical analysis

SPSS v17 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses. Categorical data are presented as absolute numbers and proportions, and continuous variables are expressed in terms of means and ranges. The correlation of results between the different serological tests was assessed through Kappa coefficient.

3. Results

Out of the 48 sera, 26 (54.2%) were r-ELISA positive/n-ELISA negative, and 22 (45.8%) were n-ELISA positive/r-ELISA negative. None of the ELISAs screening techniques gave a result in the “grey-zone”.

The patients’ countries of origin were: Bolivia (43), Argentina (1), Ecuador (1), Chile (1), Peru (1), and El Salvador (1). The mean age was 37 (range from 18 to 75) years and 33 (68.7%) were women. None of individuals presented cardiac or gastrointestinal alterations.

3.1. Confirmatory procedures

All 48 inconclusive sera were analyzed by TESA-blot and IH-WB tests. TESA-blot was positive in 22/48 (45.8%) sera, and negative in 25/48 (52.1%). In the same way, IH-WB was positive in 17/48 (35.4%) sera and negative in 30/48 (62.5%). Both techniques gave one indeterminate result. Results of the ELISAs and the two confirmatory techniques performed are shown in Table 1.

Analyzing the results of the confirmatory techniques together, they were concordant in 37/48 (77.1%) samples. We found 9/48 (18.8%) cases of discrepancies between the two WBs, however the techniques showed an overall substantial agreement (k = 0.604), and discrepancies were observed in cases where ELISAs IV results were close to the cutoff. Comparative results between the two confirmatory techniques performed are reflected in Table 2.

Table 1
Results of the ELISAs and the two confirmatory techniques performed.

	TESA-blot		
	Positive	Negative	Indeterminate
r-ELISA positive/ n-ELISA negative (n = 26)	7	19	0
n-ELISA positive/r-ELISA negative (n = 22)	15	6	1
TOTAL (n = 48)	22 (45.8%)	25 (52.1%)	1 (2.1%)
	In-house WB		
	Positive	Negative	Indeterminate
r-ELISA positive/ n-ELISA negative (n = 26)	3	23	0
n-ELISA positive/r-ELISA negative (n = 22)	14	7	1
TOTAL (n = 48)	17 (35.4%)	30 (62.5%)	1 (2.1%)

Note: Results are expressed in absolute numbers and percentages.

Table 2
Comparative results between the two confirmatory techniques performed.

		TESA-blot		
		Positive	Negative	Indeterminate
In-house WB	Positive	15 (31.2%)	2 (4.2%)	0
	Negative	7 (14.6%)	22 (45.8%)	1 (2.1%)
	Indeterminate	0	1 (2.1%)	0

Note: Results are expressed in absolute numbers and percentages.

Following our confirmed case definition, based on the positivity of one ELISA and at least one confirmatory technique, a total of 24/48 samples (50%) could be classified as positive.

3.2. Analysis of the dispersion of the screening techniques results

r-ELISA IV ranged from 0.1–2 (with an outlier of 4.3) when TESA-blot was positive, and from 0.03–1.74 when IH-WB was positive. We found a great dispersion of r-ELISA IV among individuals with TESA-blot and IH-WB negative results (0.03–6.2 and 0.4–6.2, respectively). With respect to n-ELISA, IV ranged identically from 0.48–3.49 when both confirmatory assays were positive. Finally, in individuals with TESA-blot and IH-WB negative results, n-ELISA IV ranged from 0–2.13 and 0–2.03, respectively. The overall serum index values distribution of the ELISAs compared to TESA-blot and IH-WB is shown in Fig. 1.

Additionally, n-ELISA showed a moderate agreement when compared to TESA-blot and IH-WB ($k = 0.44$ and 0.56 , respectively) while r-ELISA showed a clear disagreement with both confirmatory

techniques ($k < 0$).

3.3. Serological follow-up of patients over time

Serological data from the follow-up period of study was available in 12 of the 48 patients. Basal data of these individuals and ELISAs follow-up results over time are shown in Table 3.

Over time, most individuals obtained ELISA index values close to the cutoff. Case 3 had two repeatedly negative results after treatment while cases 4 and 7 had repeatedly positive results.

4. Discussion

Serodiscordance remains a diagnostic challenge. These individuals are clinically complicated to manage since we ignore if they are really infected or not. This condition leads to carry out clinical and analytical follow-up of the subjects without a clear diagnosis, with the implications for both, the individual and the health systems that this entails. In this situation, confirmatory techniques as WB, can help to achieve a definitive diagnosis.

Different reasons may lead to repeatedly discordant results such as the immune response host heterogeneity; strain factors, test-dependent factors, or cross-reactions with other pathogens (Riera et al., 2012; Cooley et al., 2008). To solve this problem, the WHO recommends carrying out a confirmatory test such as the WB technique (World Health Organization, 2002).

In our series, TESA-blot confirmed the infection in 45.8% of individuals with inconclusive serology. In contrast, studies performed in endemic areas in patients with inconclusive serology showed a great

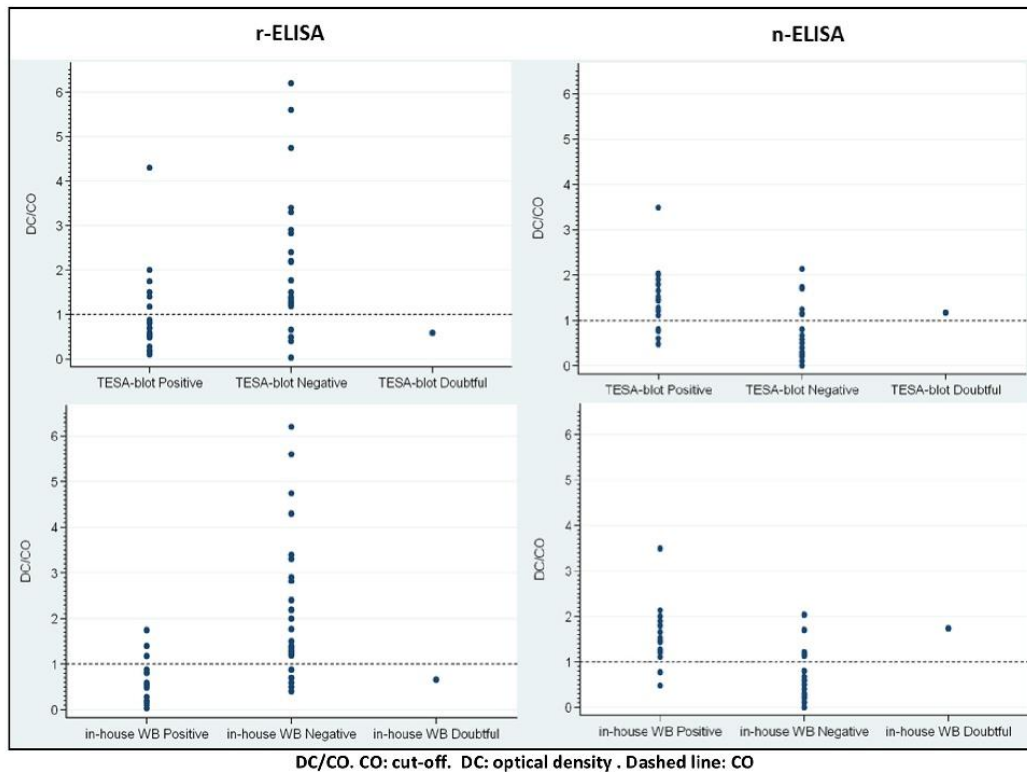


Fig. 1. ELISAs antibody indexes compared to both confirmatory tests results.

Table 3
Serological follow-up of 12 patients during 2014–2018 period.

Patient	BASAL SERUM												YEAR OF TREATMENT*					
	2014			2015			2016			2017				2018				
	YEAR	R	N	TESA-blot	IH-WB	Result	R	N	Result	R	N	Result		R	N	Result	R	N
1	2014	3,4	0,8	N	N	DIS	1,8	0,71	DIS	0,08	1,81	DIS	1,59	1,66	P			NA
2	2013	0,88	1,8	P	P	DOUBT	1	2,07	DOUBT	0,41	0,35	N	0,65	0,29	N			2014
3	2014	4,3	0,6	P	N	DIS	2,89	0,16	DIS	2,04	5,05	P	1,99	4,68	P			2015
4	2013	0,82	3,49	P	P	DIS	2,08	4,42	P	1,42	0,09	DIS	1,34	0,07	DIS	1,66	5,11	P
5	2014	2,2	0,2	N	N	DIS	2,28	0,09	DIS	1,43	0,28	DIS	1,84	2,5	P			2013
6	2014	0,4	1,7	N	N	DIS	0,45	3,34	DIS	1,43	0,28	DIS	2,12	2,48	P			NA
7	2014	0,2	2	P	P	P	1,2	2,91	P	0,11	1,64	DIS	1,38	1,38	P			2016
8	2010	1,23	0,29	N	N	P	1,43	0,28	P	0,11	1,64	DIS	0,08	0,61	N			2015
9	2014	2	0,8	P	N	P	1,46	1,54	P	0,82	0,99	DOUBT	1,14	1,1	DOUBT	1,04	1,5	DOUBT
10	2014	1,5	0,8	P	N	DIS	1,1	1,08	P	1,04	0,73	DOUBT	1,04	0,73	DOUBT			2015
11	2013	0,4	1,2	N	N	P	1,37	1,28	P	1,36	0,38	DIS	1,14	1,1	DOUBT	1,04	1,5	DOUBT
12	2014	5,6	0,3	N	N	P	1,56	0,38	P	1,04	0,73	DOUBT	1,04	0,73	DOUBT			2017
	2014	5,6	0,3	N	N	P	1,56	0,38	P	1,04	0,73	DOUBT	1,04	0,73	DOUBT			NA

P: Positive, N: Negative, DIS: Discordant, DOUBT: Doubtful, R: recombinant ELISA, N: native ELISA, NA: not applicable.
* Note: Individuals with positive confirmatory results were treated.

variability of TESA-blot positivity rates from 2.87% to 20.5% (Silveira-Lacerda et al., 2004; Furuchó et al., 2008). This could be explained since these studies used different procedures for screening what suggest that confirmatory results might vary depending on the screening techniques chosen.

Regarding the IH-WB in our series, the test confirmed 35.4% of the discordant sera. These results are not consistent with a previous study confirming only 1 out of 12 (8.33%) of the discordant sera by this IH-WB (Abrás et al., 2016). Contrary to our findings, most of the false positive and negative results in that study, were obtained by the ELISA based on native antigens.

Despite being reliable methods, both TESA-blot and the IH-WB have some limitations: WB format does not allow automation, it is not appropriate for testing a large number of samples and therefore not feasible for routine confirmation (Gomes et al., 2009). The main disadvantage of TESA-blot is the high cost and the lack of commercialization in Europe. With regard to the IH-WB is a labor-intensive procedure, not commercialized, and hence not available in take-care centres.

Regarding the dispersion of the screening technique results compared to the confirmatory results, it is noteworthy the high variability of the r-ELISA IV, especially among cases with confirmatory negative results showing values > 2. This could be explained by the composition of the r-ELISA conjugate containing anti-IgM which may generate false positive results due to their wide reactivity (Flores-Chavez et al., 2010; da Silveira et al., 2001, Boes, 2000). On the other hand, the non-negligible number of false negative results by r-ELISA could be due to a lack of reactivity to the specific antigenic epitopes included on the commercial test. Some authors have proposed new techniques using a large mixture of recombinant antigens and based on chemiluminescence detection techniques in order to improve the sensitivity of the recombinant antigen based assays (Abrás et al., 2016).

In contrast, we found a low dispersion of n-ELISA IV distribution, with values close to the cut-off, which would be expected in discordant sera. The better concordance of n-ELISA and both WB confirmatory techniques might be explained since all use native antigens of *T. cruzi*.

It is important to highlight that IV dispersion pattern of both ELISAs did not show variations depending on whether they were compared with the TESA-blot or with IH-WB. This would indicate that there are no variations between employing antigens of trypomastigote or epimastigote on the confirmatory techniques development.

According to our serological follow-up results, most individuals remain with discordant or doubtful serology over time. Some authors have documented a decrease in antibody titers from 5 years after treatment (Sosa-Estani et al., 2009). Interestingly, in our series, cases 4 and 7 (positive for both WB and treated in 2013 and 2016 respectively) obtained repeatedly positive serological results throughout the follow-up period. Only case 3 had repeatedly negative serology results after treatment. However, we consider that the follow-up period in our study is not long enough to reach any conclusion.

5. Conclusions

In summary, half of the inconclusive sera in our study could be confirmed by one ELISA and at least one of the confirmatory tests. Also, according to our results, n-ELISA seems to yield a better performance than r-ELISA in this cohort of patients. Finally, the agreement between both WB may indicate that either technique could be an efficient tool to confirm discordant results regardless of which form of the parasite's life cycle they use. However, more robust studies with a greater number of samples, and with a longer follow-up period, are needed in order to better assess the efficacy of the confirmatory techniques in inconclusive cases.

References

WHO, 2017. Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Fact Sheet [Internet]. Mar. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>.

Lescure, F.-X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L., et al., 2010. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect. Dis.* 10 (August(8)), 556–570.

Statement–Chagas disease in Europe, 2009. Recommendations of an Informal Consultation Meeting on Chagas Disease Control and Prevention in Europe. [Internet]. Available from: World Health Organization. http://www.who.int/neglected_diseases/integrated_media_chagas_statement/en/.

Chang, C.-D., Cheng, K.Y., Jiang, L.X., Salbilla, V.A., Haller, A.S., Yem, A.W., et al., 2006. Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant antigens on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. *Transfusion (Paris)* 46 (October (10)), 1737–1744.

Abras, A., Gállego, M., Llovet, T., Tebar, S., Herrero, M., Berenguer, P., et al., 2016. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a change? *J. Clin. Microbiol.* 6 (April) JCM.00142-16.

Afonso, A.M., Ebell, M.H., Tarleton, R.L., 2012. A systematic review of high quality diagnostic tests for Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (November 8(11)), e1881.

Control of Chagas disease second report of a WHO expert committee. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2002. Available from: <http://site.ebrary.com/id/10040305>.

Lapa, J.S., Saraiva, R.M., Hasslocher-Moreno, A.M., Georg, I., Souza, A.S., Xavier, S.S., et al., 2012. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31 (June(6)), 965–974.

Riera, C., Verges, M., Iniesta, L., Fisa, R., Gállego, M., Tebar, S., et al., 2012. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86 (March 1(3)), 412–416.

Umezawa, E.S., Nascimento, M.S., Kesper, N., Coura, J.R., Borges-Pereira, J., Junqueira, A.C., et al., 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34 (9), 2143–2147.

Furuchó, C.R., Umezawa, E.S., Almeida, I., Freitas, V.L., Bezerra, R., Nunes, E.V., et al., 2008. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop. Med. Int. Health* 13 (December(12)), 1527–1533.

Amato Neto, V., De Marchi, C.R., Ferreira, C.S., Ferreira, A.W., 2005. [Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 38 (December(6)), 534–535.

Moure, Z., Angheben, A., Molina, I., Gobbi, F., Espasa, M., Anselmi, M., et al., 2016. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. Jun [cited 2016 Sep 27]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1198743X01860>.

Flores-Chavez, M., Cruz, I., Rodríguez, M., Nieto, J., Franco, E., Gárate, T., et al., 2010. [Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain]. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28 (5), 284–293.

Gorlin, J., Rossmann, S., Robertson, G., Stallone, F., Hirschler, N., Nguyen, K.-A., et al., 2008. Evaluation of a new *Trypanosoma cruzi* antibody assay for blood donor screening. *Transfusion (Paris)* 48 (March (3)), 531–540.

Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Coura, J.R., Levin, M.J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., et al., 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion (Paris)* 43 (January(1)), 91–97.

Cooley, G., Etheridge, R.D., Boehlke, C., Bundy, B., Weatherly, D.B., Minning, T., et al., 2008. High throughput selection of effective serodiagnostics for *trypanosoma cruzi* infection. Milon G, editor. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2 (October 8(10)), e316.

Silveira-Lacerda, E.P., Silva, A.G., Junior, S.F., Souza, M.A., Kesper, N., Botelho-Filho, A., et al., 2004. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang.* 87 (3), 204–207.

Gomes, Y.M., Lorena, V., Luquetti, A.O., 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 115–121.

da Silveira, J.F., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 17 (6), 286–291.

Boes, M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 37 (December(18)), 1141–1149.

Sosa-Estani, S., Viotti, R., Segura, E.L., 2009. Therapy, diagnosis and prognosis of chronic Chagas disease: insight gained in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 167–180.

4. DISCUSIÓN

El 98% de los individuos con EC se diagnostican en la fase crónica de la enfermedad (Flores-Chávez et al., 2010). Teniendo en cuenta que en esta etapa la mayoría de los afectados permanecen asintomáticos y con una baja parasitemia, el diagnóstico dependerá fundamentalmente de la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* (Saez-Alquézar et al., 2000).

Cuando no se alcanza un diagnóstico concluyente, el manejo de estos individuos resulta complejo, ya que desconocemos su verdadero estado de infección. Esta situación conduce a la realización de múltiples seguimientos clínicos y serológicos con las implicaciones, tanto para el individuo como para los sistemas de salud, que ello conlleva.

Cuando dos pruebas no concuerdan podría deberse a un error técnico o a la presencia de un suero atípico (Araújo et al., 2008). Tales problemas se resuelven, generalmente, repitiendo las pruebas pero si los resultados continúan siendo discordantes se les debe prestar una especial atención. Cuando esto sucede en banco de sangre, el donante es excluido, pero si las discrepancias surgen en la práctica del diagnóstico clínico, el suero debe enviarse a un laboratorio de referencia para su confirmación.

Dado que el segundo estudio es una continuación que complementa los hallazgos obtenidos en el primer estudio, se realiza una discusión conjunta de ambos trabajos.

Uno de los objetivos del primer trabajo, *Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries*, fue establecer la prevalencia de

la serodiscordancia en el diagnóstico de la EC fuera del área endémica. Con un 22,7% de seropositividad se halló un 3,3% de serodiscordancia inicial. Estos datos concuerdan con estudios previos realizados en zona endémica donde se muestran cifras de serodiscordancia de entre el 2% -3% (Carvalho et al., 1993; Gomes et al., 2009; Lapa et al., 2012). No fue posible repetir la serología en una nueva muestra a todos los individuos con resultados discordantes, tal como propone el algoritmo diagnóstico de la OMS. Así pues, se dividió la cohorte en dos grupos de estudio: Grupo 1, población con resultados persistentemente discordantes, y Grupo 2, individuos con resultados inicialmente discordantes en los que no se pudieron repetir las pruebas serológicas. Aunque no encontramos diferencias significativas a nivel clínico, epidemiológico o analítico entre los dos grupos, observamos que en el Grupo 2 hubo un mayor porcentaje de pacientes con alteración cardíaca. Teniendo en cuenta que casi un 30% de los resultados inicialmente discordantes se hubieran resuelto repitiendo las pruebas serológicas en una nueva muestra, es probable que los pacientes con alteraciones cardíacas del Grupo 2, se hubieran confirmado como positivos con un segundo cribado.

Por otro lado se quiso valorar la utilidad diagnóstica del TESA-blot para resolver los casos sin un diagnóstico definitivo. En ambos trabajos aproximadamente la mitad de los sueros fueron confirmados como positivos por esta técnica. Estos resultados contrastan con estudios previos realizados en área endémica en los que el TESA-blot presentó tasas de positividad que van de 2,87% hasta 20,5% (Silveira-Lacerda et al., 2004; Furuchó et al., 2008). No obstante, se han reportado discordancias entre las

distintas técnicas de cribado (Souza y Amato Neto, 2012), por tanto dependiendo de la prueba elegida la concordancia con las pruebas confirmatorias podría variar.

Tras establecer el diagnóstico definitivo en el primer trabajo, se quiso analizar si había diferencias entre los individuos con resultados confirmatorios positivos y negativos y para ello se compararon las características epidemiológicas, clínicas y analíticas de ambos subgrupos (TESA-blot positivo y TESA-blot negativo) dentro del Grupo 1. Se observó que los individuos con resultados confirmatorios positivos presentaron alteraciones viscerales (1/19 cardíacas y 2/15 gastrointestinales) mientras que los individuos con resultados confirmatorios negativos no tuvieron ninguna alteración clínica. El hecho de que las alteraciones sólo se encontrasen en los individuos con infección confirmada respalda los resultados positivos del TESA-blot.

Debido a que el TESA-blot es una prueba comercial sólo disponible en Latinoamérica, uno de los objetivos principales de nuestro segundo trabajo, ***The challenge of discordant serology in Chagas disease: The role of two confirmatory techniques in inconclusive cases***, fue comparar esta técnica con el WB-IH en la resolución de casos no concluyentes. El WB-IH, desarrollado por Riera y colaboradores (Riera et al., 2012), es una técnica de uso e interpretación más compleja que el TESA-blot propuesta como una alternativa eficiente para la confirmación de casos discordantes en área no endémica. En este segundo trabajo el WB-IH fue positivo en el 35,4% de los casos, lo que contrasta con los resultados de un estudio previo donde este método sólo confirmó 1/12 (8,33%) de los casos discordantes (Abrás et al., 2016). No obstante, se ha de tener en cuenta que el tamaño de la muestra con resultados no concluyentes del estudio de Abrás y colaboradores ($n= 12$) no era representativo.

Con respecto a la concordancia de las técnicas de cribado con los test confirmatorios, en ambos trabajos se observó que el ELISA nativo tiene una concordancia mucho mayor con ambos WB que el ELISA recombinante. A raíz de este hallazgo se analizó el comportamiento de las técnicas de cribado cuando presentan resultados discrepantes a través de la dispersión de los valores índice de los ELISA con respecto a los resultados de las técnicas confirmatorias. Curiosamente se observó una amplia variabilidad en los valores índice del r-ELISA, especialmente en los casos con resultados confirmatorios negativos, llegando a valores >2 . Según estos datos, se puede afirmar que en los casos con resultados de cribado repetidamente discordantes la prueba que da lugar a un mayor número de falsos positivos es el ELISA que utiliza antígenos recombinantes. Una razón que explicaría esto es la composición del conjugado del ELISA Bioelisa Chagas Biokit® que además de anti-IgG humana contiene anti-IgM pudiendo generar resultados falsos positivos debido a su amplia reactividad (Boes, 2000; da Silveira et al., 2001; Flores-Chavez et al., 2010). Por otro lado el nada despreciable número de falsos negativos obtenidos también por r-ELISA, podría corresponder a la falta de reactividad de algunos sueros a los epítomos antigénicos incluidos en la prueba comercial. La buena concordancia entre el ELISA nativo y las técnicas confirmatorias puede ser debido a que todas utilizan antígeno nativo aunque el TESA-blot utiliza antígenos de la fase humana del parásito (tripomastigote) y cabría esperar, por tanto, una mayor especificidad.

A menudo las variaciones en el rendimiento de los diferentes test diagnósticos se han atribuido a la etapa del parásito utilizada en su preparación antigénica cuyo perfil es potencialmente diferente (Araujo y Guptill, 1984; Guzmán-Gómez et al., 2015).

Mientras que el TESA-blot incorpora antígenos de excreción-secreción de forma de tripomastigote, el WB-IH utiliza un lisado de epimastigotes (cepa Maracay) obtenido de cultivo “in vitro”. En el segundo trabajo se observó que la dispersión de los valores índice, analizando cada ELISA individualmente, tenía el mismo comportamiento independientemente de si se comparaba con los resultados de TESA-blot o con los resultados del WB-IH. Este dato y la alta concordancia mostrada entre ambos WB, pone de manifiesto que no habría diferencias entre utilizar antígenos de tripomastigotes o epimastigotes en el diseño de las pruebas confirmatorias.

Existen diferentes razones que pueden explicar las discrepancias de las pruebas en el cribado y diagnóstico de la EC:

Factores inmunológicos del hospedador

Es bien conocida la heterogenicidad de la respuesta inmunológica entre diferentes individuos frente a distintos patógenos. Se ha visto que los sujetos serodiscordantes presentan un fenotipo de células T en reposo similar al de los individuos no infectados. También se ha demostrado que estos individuos producen mayores niveles de IFN- γ y de células T CD4 + polifuncionales secretoras de IL-2 y bajos niveles de anticuerpos específicos frente a proteínas recombinantes de *T. cruzi* en comparación con los individuos seropositivos (Castro Eiro et al., 2017). Un seguimiento a largo plazo de estos sujetos confirma que la respuesta humoral y celular fluctúa pero se mantiene durante largo periodo de tiempo (Castro Eiro et al., 2017).

En la evolución natural de la EC se acepta que los individuos permanecen infectados de por vida y por eso se recomienda el tratamiento en todos los pacientes seropositivos

(Lescure et al., 2010; Rassi y Marin-Neto, 2010); no obstante esta hipótesis nunca ha sido probada. Aunque la persistencia de anticuerpos específicos en individuos infectados es un componente común de la respuesta inmune, algunos autores postulan que estudios de seguimiento a largo plazo de individuos con serología de bajo nivel reactivo, demostrarían tasas moderadas de seroreversión (Sabino et al., 2013). Un estudio de 10 años de seguimiento en sujetos serológicamente positivos y sin tratamiento tripanocida previo, demostró que los niveles de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* disminuían en aquellos individuos con resultados de PCR negativos persistentes en el tiempo (Sabino et al., 2013). La ausencia de ADN del parásito y una disminución mantenida de anticuerpos reactivos, indicarían una falta de estimulación antigénica que respaldaría esta hipótesis. Se ha postulado que las respuestas humoral y celular en sujetos con serología discordante podrían indicar una exposición previa a la infección y el establecimiento de memoria inmunológica sugestiva de infección resuelta (Castro Eiro et al., 2017). Esta hipótesis podría explicar la serodiscordancia basal en nuestros casos de estudio pudiendo haber estado expuestos y hallarse en una fase de bajada de anticuerpos, con lo que los resultados de los distintos test irían negativizando pero no necesariamente a la vez. Un seguimiento longitudinal de estos individuos permitiría la aceptación o el rechazo de esta suposición.

La seroreversión en ausencia de tratamiento ha sido descrita como un evento poco común (Francolino et al., 2003; Dias et al., 2008) y la explicación más aceptada para estos "casos raros" es la falta de reproducibilidad de los ensayos serológicos originales (Sabino et al., 2013). Demostrar la resolución espontánea de la infección tendría muchas implicaciones, incluida la necesidad de desarrollar ensayos / algoritmos

confirmatorios que puedan diferenciar la infección activa de la no activa en función de una combinación de anticuerpos y resultados de PCR. En tal caso, la evolución de la enfermedad chagásica podría compararse con la evolución de otras enfermedades infecciosas como la malaria donde en ausencia de exposición repetida al parásito la infección podría resolverse y, tras un periodo de tiempo los paciente serorevertirían volviendo a niveles basales normales (Sabino et al., 2013). Por ello hay grupos que no recomiendan el tratamiento con los fármacos actuales en individuos con una infección potencialmente resuelta (PCR-negativa y seroreactividad de bajo nivel) ya que presentan una eficacia moderada y graves efectos secundarios (Sabino et al., 2013).

Por otro lado, múltiples estudios han monitorizado la respuesta inmunológica en pacientes tratados. A pesar de que se ha visto una disminución de los niveles de anticuerpos a largo plazo (Sosa-Estani et al., 2009; Sguassero et al., 2015), la mayoría de ellos siguen siendo serológicamente positivos o no concluyentes años después de tratamiento (Murcia et al., 2010; Aguiar et al., 2011). En el segundo estudio se observó que la mayoría de los individuos mantuvieron resultados serológicos discordantes o cercanos al punto de corte a lo largo del periodo de seguimiento, incluso tras el tratamiento. Los mecanismos responsables de esta persistencia de anticuerpos se desconocen. Una hipótesis es que un pequeño número de parásitos estarían secuestrados en los tejidos siendo capaces de mantener una respuesta inmune persistente (Tarleton y Zhang, 1999). Otra teoría es que la respuesta inmune producida en la fase aguda de la infección conduciría a la producción de auto-anticuerpos con reactividad cruzada que persistirían por estimulación permanente por parte de auto-antígenos humanos. Ambas hipótesis podrían ser correctas ya que

además no son excluyentes (Flores-Chávez et al., 2006). Curiosamente en dos de los casos tratados en nuestra serie, los valores índice de las técnicas diagnósticas aumentaron con el tiempo obteniendo resultados repetidamente positivos. Solamente en un caso los valores índice de los ELISA disminuyeron tras el tratamiento llegando incluso a serorevertir. No obstante, el periodo de seguimiento del presente trabajo no es lo suficientemente largo como para poder extraer conclusiones.

Por otra parte, hay estudios que muestran una caída sistemática de anticuerpos en pacientes tratados pero con fracaso de tratamiento basado en la detección de ADN de *T. cruzi* por PCR (Fernandes et al., 2009; Aguiar et al., 2011). No hay que olvidar que al igual que ocurre con la parasitemia, los títulos de anticuerpos oscilan durante el período de infección y la valoración de la serología no se corresponde necesariamente con la cantidad de parásitos que circulan (Aguiar et al., 2011).

Sin pruebas parasitológicas lo suficientemente sensibles o biomarcadores de infección no se puede determinar de manera concluyente si los sujetos que tienen resultados discordantes están verdaderamente infectados o simplemente han estado "expuestos". Del mismo modo, no existe forma ética de determinar con 100% de certeza la eficacia de tratamiento en infección crónica (Laucella et al., 2009). Además, no podemos excluir la posibilidad de que otras infecciones o condiciones inmunológicas den resultados positivos en estos ensayos que utilizan múltiples antígenos recombinantes (Cooley et al., 2008).

Factores de la cepa: diversidad genética

Independientemente de la técnica y del lugar geográfico donde sea utilizada, el resultado diagnóstico debería ser el mismo, sin embargo no siempre es así (Caballero et al., 2007; Guzmán-Gómez et al., 2015). La diversidad genética del parásito se ha postulado como un motivo de serodiscordancia o infradiagnóstico (Flores-Chavez et al., 2012).

En un estudio realizado en México cuyo objetivo era determinar la seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* usando una combinación de 5 ELISA basados en diferentes preparaciones antigénicas, se observó una gran proporción de resultados discordantes (32,1%). De 196 muestras analizadas, solamente 1 fue reactiva a los 5 test. Sin embargo, todos los sueros fueron confirmados por un WB que incluía antígenos crudos de las UDTs Tc I, Tc II y Tc VI, lo que indica que las muestras no eran falsos positivos de los ELISA sino verdaderos positivos confirmados (Guzmán-Gómez et al., 2015).

Otro estudio evaluó la sensibilidad y especificidad de dos test de diagnóstico rápido, Chagas Stat-Pak® Assay (Chembio Diagnostic Systems) y Trypanosoma Detect™ Rapid Test (InBios International), en sujetos de origen boliviano y de origen peruano. En las muestras de origen boliviano, Stat-Pak y Trypanosoma Detect obtuvieron valores de sensibilidad de 87,5% y 90,7%, respectivamente; con un 100% de especificidad de ambos test. Sin embargo la sensibilidad en muestras de origen peruano fue mucho menor: 26,6-33,0% (Stat-Pak) y 54,3-55,2% (Trypanosoma Detect); con valores de especificidad > 98% (Verani et al., 2009). Estos resultados concuerdan con un posterior estudio donde se evaluó Stat-Pack en población de origen brasileño y boliviano

alcanzando valores de sensibilidad y especificidad más altos en los individuos bolivianos (Chappuis et al., 2010).

Las diferencias antigénicas entre las distintas cepas del parásito que circulan en diferentes áreas endémicas pueden generar variaciones en la respuesta inmune (Verani et al., 2009; Balouz et al., 2017) y en ocasiones los valores de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas pueden ser sobreestimados si los estudios de validación se llevan a cabo en una sola área geográfica.

Utilizar una mezcla más amplia de antígenos recombinantes que incluya todas las cepas mejoraría el rendimiento de los test en todas las áreas endémicas (Umezawa et al., 2003; Vega Benedetti et al., 2013). Por otro lado, algunos autores consideran que se deben incluir cepas locales en el desarrollo de los test para asegurar valores de sensibilidad y especificidad óptimos y someterse a pruebas de campo en cada sitio geográfico antes de su implementación (Verani et al., 2009).

En el presente estudio la variación de la respuesta inmune “UDT-dependiente” quedaría descartada ya que nuestra población era en su mayoría de origen boliviano y ambos ELISA han demostrado una sensibilidad y especificidad óptimas en este grupo de población.

Factores del test utilizado

Aunque la sensibilidad y especificidad de los test de diagnóstico y cribado han mejorado significativamente en los últimos años, la detección de muestras con bajo nivel de anticuerpos o resultados discordantes sigue siendo un reto. Según los resultados de este trabajo el ELISA que utiliza antígeno nativo parece tener un mejor

rendimiento que el ELISA que usa antígenos recombinantes, hecho que concuerda con la recomendación de la OMS que afirma que en caso de discordancias se debe considerar correcto el resultado de la prueba convencional (OMS, 2002).

La mayoría de los ensayos serológicos se validan usando muestras positivas consenso con títulos altos de anticuerpos donde se descartan los discordantes. Esta práctica tiende a sobreestimar los valores diagnósticos de los test ya que no se aborda realmente el rendimiento en muestras con títulos bajos de anticuerpos o especímenes no concluyentes (Otani et al., 2009; Afonso et al., 2012).

Ni siquiera los estudios comparativos promovidos por la OMS hace casi una década pudieron resolver los resultados discrepantes ya que en el establecimiento de estos “positivos consenso” y “negativos consenso” siempre hay un sesgo de selección (Otani et al., 2009). Además, los estudios casos-contróles continúan siendo el método más extendido para evaluar los test, a pesar de que estudios prospectivos de cohortes con un estándar de referencia proporcionan una mejor estimación de la precisión diagnóstica de las pruebas (Afonso et al., 2012).

Una revisión donde se evaluaron 61 ensayos diagnósticos diferentes de 18 estudios concluyó que los test basados en técnicas ELISA y los no basados en dicha técnica mostraban valores similares de sensibilidad y especificidad. Por su parte los test comerciales resultaron ser más sensibles que los no comerciales y se observó que el rendimiento fue mayor en estudios llevados a cabo en banco de sangre en comparación con test evaluados en terreno (Afonso et al., 2012).

En los últimos tiempos, la inversión en el desarrollo de nuevas y mejores herramientas diagnósticas, utilizando una mayor comprensión de la composición genética de *T. cruzi* así como nuevas tecnologías, se ha convertido en una prioridad para la OMS (Médecins, 2008; OMS, 2017).

Estrategias de futuro

El test ideal sería una prueba universal, disponible y fácil de realizar, que detecte todas las cepas del parásito y que no presente reactividad cruzada (Porrás et al., 2015). El hecho de utilizar proteínas recombinantes de las distintas formas vitales del parásito (epimastigote, tripomastigote y amastigote) y que abarque todas las UDT podría ser una estrategia que aumentaría la sensibilidad diagnóstica.

Algunos autores sostienen que en la práctica del cribado de la infección (bancos de sangre, donantes de órganos) la técnica utilizada debería ser lo más sensible posible ya que un falso negativo podría tener consecuencias graves. Por otro lado, en la práctica del diagnóstico de laboratorio, los test deben tener una alta especificidad con el fin de evitar resultados falsos positivos que conducirían a un tratamiento innecesario y al sufrimiento psicológico del paciente (da Silveira et al., 2001).

Así pues, se ha propuesto la realización de una sola técnica altamente sensible basada en quimioluminiscencia tanto para el cribado como para el diagnóstico de la EC (Abrás et al., 2016) (Pérez-Ayala et al., 2018). De esta manera se asegura que a partir de un punto de corte establecido, todos los individuos con resultados positivos son verdaderos positivos. Sólo los resultados débilmente reactivos dentro de una zona

considerada “gris” deberán ser confirmados por una segunda técnica tal como como ocurre en otras infecciones como el VIH (García et al., 2011).

Las plataformas diagnósticas de nueva generación han mejorado la precisión del diagnóstico de la EC usando diferentes proteínas recombinantes en una gran variedad de sistemas de detección como quimioluminiscencia, resonancia por plasmones superficiales o microesferas (Luz et al., 2016), incluyendo citometría (Teixeira-Carvalho et al., 2015) o microarrays líquidos (Santos et al., 2016). Por otro lado se encuentran en fases de desarrollo ensayos de diagnóstico directo que utilizan anticuerpos policlonales para la detección de antígenos circulantes en plasma y orina que demuestren la presencia del parásito (Málaga-Machaca et al., 2017). No obstante, no debemos olvidar que el ensayo ideal ha de estar disponible y ser fácil de realizar para poder incorporarlo en la rutina de un laboratorio de diagnóstico.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. Los procedimientos actuales para el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* varían en sensibilidad y especificidad. En ausencia de un método de confirmación de referencia para la resolución de casos no-concluyentes, resulta difícil alcanzar un diagnóstico definitivo a nivel individual y determinar el impacto real de la enfermedad a nivel de los sistemas de salud.
2. Tras el cribado de la infección por *T. cruzi* durante un periodo de 4 años en dos países europeos con una alta tasa de población latinoamericana y siguiendo el algoritmo diagnóstico de la OMS, se observó un 22,7% de prevalencia de infección y un de 3,3% de serodiscordancia inicial.
3. TESA-blot confirmó la infección en aproximadamente la mitad de los sujetos con resultados serológicos discordantes en los dos estudios y el WB-IH en un 35,4% en los individuos del segundo estudio.
4. Ambas técnicas confirmatorias, basados en WB, presentaron una buena concordancia, independientemente de la fase del parásito que utilizaban en su composición. Este resultado sugiere que no habría diferencias entre utilizar antígenos de tripomastigotes, (TESA-blot) o epimastigotes (WB-IH) en el diseño de las pruebas confirmatorias.
5. Un resultado positivo de una técnica confirmatoria favorece el acceso a tratamiento disminuyendo el riesgo de desarrollar complicaciones. Por otro lado un resultado confirmatorio negativo evita la realización de seguimientos clínicos y serológicos lo que resulta en un ahorro para los sistemas de salud y en un descanso

emocional para el paciente ya que la EC supone un estigma social para quien la padece.

6. La principal desventaja de los ensayos confirmatorios utilizados en el presente trabajo es su falta de disponibilidad. La comercialización del TESA-blot se limita a Latinoamérica por lo que no es posible el acceso a esta técnica en países fuera del área endémica. Por su parte, la complejidad de uso del WB-IH dificulta la implementación en centros sin la infraestructura necesaria y con una alta carga asistencial. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de establecer una técnica confirmatoria disponible y fácil de realizar en laboratorios de referencia para la resolución de casos no concluyentes.

7. Los individuos con resultados positivos de TESA-blot presentaron alteraciones viscerales (1/19 cardíacas y 2/15 gastrointestinales) mientras que en los individuos con resultados negativos no se observó ninguna alteración. El hecho de que las alteraciones viscerales sólo se encontrasen en los individuos con infección confirmada respalda los resultados del TESA-blot.

8. El ELISA que incluye antígeno nativo parece tener un mejor rendimiento que el ELISA que utiliza antígenos recombinantes cuando los resultados entre ambas pruebas son contradictorios.

9. Se ha propuesto utilizar una sólo técnica de alta sensibilidad y especificidad para el cribado de la infección confirmando solamente aquellos resultados débilmente reactivos. Bajo esta premisa, es de suponer que los individuos con resultados concordantes por ambas técnicas de cribado del primer estudio (96,7%), hubieran

alcanzado un diagnóstico definitivo con una sola técnica lo que hubiera supuesto un ahorro considerable para el sistema de salud.

10. El seguimiento de los individuos con serodiscordancia persistente mostró que la mayoría de los casos obtuvieron resultados discordantes o con valores índice próximos al *cut-off* a corto plazo. Estos individuos podrían hallarse en una fase de bajada de anticuerpos que podría llegar a la seroreversión a largo plazo.

Referencias bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.* JCM.00142-16. <https://doi.org/10.1128/JCM.00142-16>
- Aguiar, C., Batista, A.M., Pavan, T.B.S., Almeida, E.A., Guariento, M.E., Wanderley, J.S., Costa, S.C.B., 2011. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benzonidazole: PCR evaluation of chagas disease treatment. *Trop. Med. Int. Health* no. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2011.02936.x>
- Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruiz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 201, 1308–1315.
- Amato Neto, V., De Marchi, C.R., Ferreira, C.S., Ferreira, A.W., 2005. [Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 38, 534–535. <https://doi.org/S0037-86822005000600019>
- Angheben, 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.
- Araújo, A.B., Vianna, E.E.S., Berne, M.E.A., 2008. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody detection in blood donors in the Southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 12, 480–482.
- Araujo, F.G., Guptill, D., 1984. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 362–371.
- Aznar, C., Liegeard, P., Mariette, C., Lafon, S.O., Levin, M.J., Hontebeyrie, M., 1997. A simple *Trypanosoma cruzi* enzyme-linked immunoassay for control of human infection in nonendemic areas. *Immunol. Med. Microbiol.* 18, 31–37.
- Balouz, V., Agüero, F., Buscaglia, C.A., 2017. Chagas Disease Diagnostic Applications, in: *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 1–45. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2016.10.001>
- Balouz, Virginia, Melli, L.J., Volcovich, R., Moscatelli, G., Moroni, S., González, N., Ballering, G., Bisio, M., Ciocchini, A., Buscaglia, C.A., Altcheh, J., 2017. The Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi* improves treatment evaluation and diagnosis in pediatric Chagas disease. *J. Clin. Microbiol.* JCM.01317-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01317-17>
- Basile, L., Jansa, J.M., Carlier, Y., Salamanca, D.D., Angheben, A., Bartoloni, A., Seixas, J., Van Gool, T., Canavate, C., Flores-Chavez, M., others, 2011. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. *Euro Surveill* 16, 19968.
- Bern, C., 2015. Chagas' Disease. *N. Engl. J. Med.* 373, 456–466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bern, C., Montgomery, S.P., Herwaldt, B.L., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., Dantas, R.O., Maguire, J.H., Acquatella, H., Morillo, C., Kirchhoff, L.V., Gilman, R.H., Reyes, P.A., Salvatella, R., Moore, A.C., 2007. Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *JAMA* 298, 2171. <https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>
- Berrizbeitia, M., Ndao, M., Bubis, J., Gottschalk, M., Ache, A., Lacouture, S., Medina, M., Ward, B.J., 2006. Purified Excreted-Secreted Antigens from *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes as Tools for Diagnosis of Chagas' Disease. *J. Clin. Microbiol.* 44, 291–296. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.2.291-296.2006>

- BOE, 2005. Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión.
- Boes, M., 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. *Mol. Immunol.* 37, 1141–1149.
- Brasil, P.E., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A.M., Sangenis, L.H., Braga, J.U., 2010. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 10, 337.
- Brisse, S., Henriksson, J., Barnabé, C., Douzery, E.J.P., Berkvens, D., Serrano, M., De Carvalho, M.R.C., Buck, G.A., Dujardin, J.-C., Tibayrenc, M., 2003. Evidence for genetic exchange and hybridization in *Trypanosoma cruzi* based on nucleotide sequences and molecular karyotype. *Infect. Genet. Evol.* 2, 173–183.
- Burgos, J.M., Begher, S., Silva, H.M.V., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M.J., Macedo, A.M., Schijman, A.G., 2008. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 294–297.
- Burgos, J.M., Diez, M., Vigliano, C., Bisio, M., Risso, M., Duffy, T., Cura, C., Brusses, B., Favaloro, L., Leguizamon, M.S., Lucero, R.H., Laguens, R., Levin, M.J., Favaloro, R., Schijman, A.G., 2010. Molecular Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in End-Stage Chronic Chagas Heart Disease and Reactivation after Heart Transplantation. *Clin. Infect. Dis.* 51, 485–495. <https://doi.org/10.1086/655680>
- Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., Umezawa, E.S., 2007. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00127-07>
- Camussone, C., Gonzalez, V., Belluzo, M.S., Pujato, N., Ribone, M.E., Lagier, C.M., Marcipar, I.S., 2009. Comparison of Recombinant *Trypanosoma cruzi* Peptide Mixtures versus Multiepitope Chimeric Proteins as Sensitizing Antigens for Immunodiagnosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 899–905. <https://doi.org/10.1128/CVI.00005-09>
- Cancino-Faure, B., Alcover, M.M., Fisa, R., Jimenez-Marco, T., Riera, C., 2016. Detection and Quantification of Viable and Nonviable *Trypanosoma cruzi* Parasites by a Propidium Monoazide Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1282–1289. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0693>
- Cancino-Faure, B., Fisa, R., Riera, C., Bula, I., Girona-Llobera, E., Jimenez-Marco, T., 2015. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors: *Trypanosoma cruzi* PLT CONCENTRATES. *Transfusion (Paris)* 55, 1249–1255. <https://doi.org/10.1111/trf.12989>
- Cardoso, M.S., Reis-Cunha, J.L., Bartholomeu, D.C., 2016. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., Albajar Vinas, P., 2011. Congenital Chagas Disease: Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1250. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001250>
- Carvalho, M.R., Krieger, M.A., Almeida, E., Oelemann, W., Shikanai-Yassuda, M.A., Ferreira, A.W., Pereira, J.B., Sáez-Alquizar, A., Dorlhiac-Llacer, P.E., Chamone, D.F., 1993. Chagas' disease diagnosis: evaluation of several tests in blood bank screening. *Transfusion (Paris)* 33, 830–834.
- Castro Eiro, M.D., Alvarez, M.G., Cooley, G., Viotti, R.J., Bertocchi, G.L., Lococo, B., Albareda, M.C., De Rissio, A.M., Natale, M.A., Parodi, C., Tarleton, R.L., Laucella, S.A., 2017. The Significance of Discordant Serology in Chagas Disease: Enhanced T-Cell Immunity to

- Trypanosoma cruzi in Serodiscordant Subjects. *Front. Immunol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01141>
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1, 159–218.
- Chappuis, F., Mauris, A., Holst, M., Albajar-Vinas, P., Jannin, J., Luquetti, A.O., Jackson, Y., 2010. Validation of a Rapid Immunochromatographic Assay for Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection among Latin-American Migrants in Geneva, Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 48, 2948–2952. <https://doi.org/10.1128/JCM.00774-10>
- Cooley, G., Etheridge, R.D., Boehlke, C., Bundy, B., Weatherly, D.B., Minning, T., Haney, M., Postan, M., Laucella, S., Tarleton, R.L., 2008. High Throughput Selection of Effective Serodiagnostics for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2, e316. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000316>
- Córdova Rojas, M., Cruz Torrico, M., Torrico, F., 2015. Estandarización de la técnica para la obtención de trypomastigotes en células 3T3 a partir de una cepa local de epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Gac. Médica Boliv.* 38, 6–9.
- Coura, J.R., Borges-Pereira, J., 2010. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop.* 115, 5–13. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.03.008>
- Coura, J.R., Viñas, P.A., 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6–S7.
- da Silveira, J.F., Umezawa, E.S., Luquetti, A.O., 2001. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol.* 17, 286–291.
- de Souza, W.V., Barros, M. da S., Nakazawa, M., Krieger, M.A., Gomes, Y. de M., Santos, F.L.N., 2016. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1034–1039. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0820>
- Dias, J.C.P., Dias, E., M Filho, O., Vitelli-Avelar, D., Correia, D., Lages, E., Prata, A., 2008. Further evidence of spontaneous cure in human Chagas disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 41, 505–506.
- Duffy, T., Bisio, M., Altchek, J., Burgos, J.M., Diez, M., Levin, M.J., Favaloro, R.R., Freilij, H., Schijman, A.G., 2009. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e419. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000419>
- Duffy, T., Cura, C.I., Ramirez, J.C., Abate, T., Cayo, N.M., Parrado, R., Bello, Z.D., Velazquez, E., Muñoz-Calderon, A., Juiz, N.A., Basile, J., Garcia, L., Riarte, A., Nasser, J.R., Ocampo, S.B., Yadon, Z.E., Torrico, F., de Noya, B.A., Ribeiro, I., Schijman, A.G., 2013. 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, e2000. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000>
- Dutra, W.O., Menezes, C.A.S., Magalhães, L.M.D., Gollob, K.J., 2014. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 36, 377–387. <https://doi.org/10.1111/pim.12107>
- El-Sayed, N.M., 2005. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309, 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.1112181>
- Fernandes, C.D., Tiecher, F.M., Balbinot, M.M., Liarte, D.B., Scholl, D., Steindel, M., Romanha, A., 2009. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 27–32.
- Fernandes, M.C., Andrews, N.W., 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* : a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 734–747. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>

- Fernandez-Villegas, A., Thomas, M.C., Carrilero, B., Lasso, P., Egui, A., Murcia, L., Segovia, M., Alonso, C., López, M.C., 2016. A 12-mer repetitive antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* is a potential marker of therapeutic efficacy in chronic Chagas' disease. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2005–2009.
<https://doi.org/10.1093/jac/dkw090>
- Flores-Chavez, M., Bosseno, M.-F., Bastrenta, B., Dalenz, J.-L.A., Hontebeyrie, M., Revollo, S., Breniere, S.F., 2006. Polymerase chain reaction detection and serologic follow-up after treatment with benznidazole in Bolivian children infected with a natural mixture of *Trypanosoma cruzi* I and II. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 497–501.
- Flores-Chavez, M., Cruz, I., Nieto, J., Garate, T., Navarro, M., Perez-Ayala, A., Lopez-Velez, R., Canavate, C., 2012. 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. Vaccine Immunol.* 19, 1353–1359.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.00227-12>
- Flores-Chavez, M., Cruz, I., Rodríguez, M., Nieto, J., Franco, E., Gárate, T., Cañavate, C., 2010. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 28, 284–293.
- Flores-Chávez, M., de Fuentes, I., Gárate, T., Cañavate, C., 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 25, 29–37.
- Flores-Chavez, M., Vázquez-Dominguez, I., Hernández, M., Gárate, T., Nieto, J., 2014. Sensitivity and specificity of LIAISON® XL MUREX Chagas assay for diagnosis of the *Trypanosoma cruzi* infection in non-endemic area (Spain).
- Flores-Chavez, M.D., Sambri, V., Schottstedt, V., Higuera-Escalante, F.A., Roessler, D., Chaves, M., Laengin, T., Martinez, A., Fleischer, B., 2018. Evaluation of the Elecsys® Chagas Assay for the Detection of *Trypanosoma cruzi*- Specific Antibodies in a Multicenter Study in Europe and Latin America. *J. Clin. Microbiol.* JCM.01446-17.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01446-17>
- Francolino, S.S., Antunes, A.F., Talice, R., Rosa, R., Selanikio, J., Rezende, J.M. de, Romanha, Á.J., Dias, J.C.P., 2003. New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 36, 103–107.
- Furuchó, C.R., Umezawa, E.S., Almeida, I., Freitas, V.L., Bezerra, R., Nunes, E.V., Sanches, M.C., Guastini, C.M., Teixeira, A.R., Shikanai-Yasuda, M.A., 2008. Inconclusive results in conventional serological screening for Chagas' disease in blood banks: evaluation of cellular and humoral response. *Trop. Med. Int. Health* 13, 1527–1533.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02172.x>
- Gadelha, A.Á.M., Verçosa, A.F.A., Lorena, V.M.B., Nakazawa, M., Carvalho, A.B., Souza, W.V., Ferreira, A.G.P., Silva, E.D., Krieger, M.A., Goldenberg, S., others, 2003. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and the haemagglutination test. *Vox Sang.* 85, 165–170.
- Gállego Berenguer, 2007. *Manual de parasitología: morfología y biología de los parásitos de interés sanitario*. Edicions Universitat Barcelona.
- Gascon, J., Bern, C., Pinazo, M.-J., 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115, 22–27.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>
- Girones, N., Rodriguez, C.I., Basso, B., Bellon, J.M., Resino, S., Munoz-Fernandez, M.A., Gea, S., Moretti, E., Fresno, M., 2001. Antibodies to an Epitope from the Cha Human Autoantigen Are Markers of Chagas' Disease. *Clin. Vaccine Immunol.* 8, 1039–1043.
<https://doi.org/10.1128/CDLI.8.6.1039-1043.2001>

- Gomes, Y.M., Lorena, V., Luquetti, A.O., 2009. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 115–121.
- Granjon, E., Dichtel-Danjoy, M.-L., Saba, E., Sabino, E., Campos de Oliveira, L., Zrein, M., 2016. Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004596. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004596>
- Guhl, F., Auderheide, A., Ramírez, J.D., 2014. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int. J. Parasitol.* 44, 605–612. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.02.005>
- Guzmán-Gómez, D., López-Monteón, A., de la Soledad Lagunes-Castro, M., Álvarez-Martínez, C., Hernández-Lutzon, M.J., 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. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1072-2>
- Kierszenbaum, F., 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 12, 210–223.
- Lapa, J.S., Saraiva, R.M., Hasslocher-Moreno, A.M., Georg, I., Souza, A.S., Xavier, S.S., Brasil, P.E.A.A., 2012. Dealing with initial inconclusive serological results for chronic Chagas disease in clinical practice. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31, 965–974. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1393-9>
- Laucella, S.A., Mazliah, D.P., Bertocchi, G., Alvarez, M.G., Cooley, G., Viotti, R., Albareda, M.C., Lococo, B., Postan, M., Armenti, A., Tarleton, R.L., 2009. Changes in *Trypanosoma cruzi* –Specific Immune Responses after Treatment: Surrogate Markers of Treatment Efficacy. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1675–1684. <https://doi.org/10.1086/648072>
- Lescure, F.-X., Le Loup, G., Freilij, H., Develoux, M., Paris, L., Brutus, L., Pialoux, G., 2010. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect. Dis.* 10, 556–570.
- Longhi, Niborski, L.L., Longhi, S.A., Schijman, A.G., Lafon, S.O., Gómez, K.A., Luquetti, A.O., Levin, M.J., 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0533>
- Machado, F.S., Dutra, W.O., Esper, L., Gollob, K.J., Teixeira, M.M., Factor, S.M., Weiss, L.M., Nagajyothi, F., Tanowitz, H.B., Garg, N.J., 2012. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin. Immunopathol.* 34, 753–770. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>
- Marcipar, I.S., Lagier, C.M., 2012. Advances in serological diagnosis of Chagas' disease by using recombinant proteins. INTECH Open Access Publisher.
- Mateus, J., Pérez-Antón, E., Lasso, P., Egui, A., Roa, N., Carrilero, B., González, J.M., Thomas, M.C., Puerta, C.J., López, M.C., Cuéllar, A., 2017. Antiparasitic Treatment Induces an Improved CD8⁺ T Cell Response in Chronic Chagasic Patients. *J. Immunol.* 198, 3170–3180. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602095>
- Moreira, D., López-García, P., Vickerman, K., 2004. 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.* 54, 1861–1875. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63081-0>
- Moreira, O.C., Ramírez, J.D., Velázquez, E., Melo, M.F.A.D., Lima-Ferreira, C., Guhl, F., Sosa-Estani, S., Marin-Neto, J.A., Morillo, C.A., Britto, C., 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients

- with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 125, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.020>
- Muñoz, J., Gómez i Prat, J., Gállego, M., Gimeno, F., Treviño, B., López-Chejade, P., Ribera, O., Molina, L., Sanz, S., Pinazo, M.J., Riera, C., Posada, E.J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.005>
- Murcia, L., Carrilero, B., Munoz, M.J., Iborra, M.A., Segovia, M., 2010. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 1759–1764. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq201>
- Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M.A., Segovia, M., 2013. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31, 26–34.
- Oliveira, I., Torrico, F., Muñoz, J., Gascon, J., 2010. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8, 945–956. <https://doi.org/10.1586/eri.10.74>
- OMS, 2017. Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet.
- OMS (Ed.), 2010. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Department of Reproductive health and Research, World Health Organization, Geneva.
- OMS, 2007. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. OMS.
- OMS (Ed.), 2002. Control of chagas disease: second report of the WHO Expert Committee, Control of Chagas disease. OMS, Geneva.
- Otani, M.M., Vinelli, E., Kirchhoff, L.V., del Pozo, A., Sands, A., Vercauteren, G., Sabino, E.C., 2009. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion (Paris)* 49, 1076–1082. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2009.02107.x>
- Pereira, K.S., Schmidt, F.L., Guaraldo, A.M., Franco, R.M., Dias, V.L., Passos, L.A., 2009. Chagas' disease as a foodborne illness. *J. Food Prot.* 72, 441–446.
- Pérez-Ayala, A., Fradejas, I., Rebollo, L., Lora-Pablos, D., Lizasoain, M., Herrero-Martínez, J.M., 2018. Usefulness of the ARCHITECT Chagas® assay as a single test for the diagnosis of chronic Chagas disease. *Trop. Med. Int. Health TM IH* 23, 634–640. <https://doi.org/10.1111/tmi.13063>
- Pérez-Ayala, A., Pérez-Molina, J.A., Norman, F., Navarro, M., Monge-Maillo, B., Díaz-Menéndez, M., Peris-García, J., Flores, M., Cañavate, C., López-Vélez, R., 2011. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1108–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03423.x>
- Perez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *Lancet* 391, 82–94.
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2017. Chagas disease. *The Lancet.* [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Pérez-Molina, J.A., Perez, A.M., Norman, F.F., Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2015. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00243-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00243-1)
- Picka, M.C.M., Meira, D.A., Carvalho, T.B. de, Peresi, E., Marcondes-Machado, J., 2007. Definition of a diagnostic routine in individuals with inconclusive serology for Chagas disease. *Braz. J. Infect. Dis.* 11, 226–233.
- Pinazo, M.-J., Thomas, M.-C., Bustamante, J., Almeida, I.C. de, Lopez, M.-C., Gascon, J., 2015. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 110, 422–432. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140435>

- Pinho, R.T., Waghbi, M.C., Cardillo, F., Mengel, J., Antas, P.R.Z., 2016. Scrutinizing the Biomarkers for the Neglected Chagas Disease: How Remarkable! *Front. Immunol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00306>
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., Gascón, J., Prat, J.G., Portús, M., Sauleda, S., 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.019>
- Portela-Lindoso, A.A.B., Shikanai-Yasuda, M.A., 2003. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev. Saúde Pública* 37, 107–115.
- Ramírez, J.C., Cura, C.I., da Cruz Moreira, O., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., Ramírez, J.D., Alberti, A., Pavia, P., Flores-Chávez, M.D., Muñoz-Calderón, A., Pérez-Morales, D., Santalla, J., Marcos da Matta Guedes, P., Peneau, J., Marcet, P., Padilla, C., Cruz-Robles, D., Valencia, E., Crisante, G.E., Greif, G., Zulantay, I., Costales, J.A., Alvarez-Martínez, M., Martínez, N.E., Villarroel, R., Villarroel, S., Sánchez, Z., Bisio, M., Parrado, R., Maria da Cunha Galvão, L., Jácome da Câmara, A.C., Espinoza, B., Alarcón de Noya, B., Puerta, C., Riarte, A., Diosque, P., Sosa-Estani, S., Guhl, F., Ribeiro, I., Aznar, C., Britto, C., Yadón, Z.E., Schijman, A.G., 2015. 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, 605–615. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>
- Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet* 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Requena-Méndez, A., Albajar-Viñas, P., Angheben, A., Chiodini, P., Gascón, J., Muñoz, J., Group, C.D.C.W., others, 2014. Health policies to control chagas disease transmission in European countries.
- Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D.A.J., Gascon, J., Muñoz, J., 2015. Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9, e0003540. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003540>
- Riera, C., Verges, M., Iniesta, L., Fisa, R., Gallego, M., Tebar, S., Portus, M., 2012. 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0111>
- Roca Saumell, C., Soriano-Arandes, A., Solsona Díaz, L., Gascón Brustenga, J., 2015. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Aten. Primaria* 47, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.aprim.2015.01.002>
- Sabino, E.C., Lee, T.-H., Montalvo, L., Nguyen, M.L., Leiby, D.A., Carrick, D.M., Otani, M.M., Vinelli, E., Wright, D., Stramer, S.L., Busch, M., NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II) International Program, 2013. Antibody levels correlate with detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by sensitive polymerase chain reaction assays in seropositive blood donors and possible resolution of infection over time: *T. CRUZI* ANTIBODY LEVELS AND PCR STATUS. *Transfusion (Paris)* 53, 1257–1265. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2012.03902.x>
- Saez-Alquézar, A., Sabino, E.C., Salles, N., Chamone, D.F., Hulstaert, F., Pottel, H., Stoops, E., Zrein, M., 2000. Serological confirmation of Chagas' disease by a recombinant and peptide antigen line immunoassay: INNO-LIA Chagas. *J. Clin. Microbiol.* 38, 851–854.
- Sales Junio, P., Molina, I., Fonseca Murta, Sánchez-Montalvá, A., Corrêa-Oliveira, R., Salvador, F., Martins Carneiro, C., 2017. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease:

- A Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 1289–1303. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0761>
- Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Pou, D., Sánchez-Montalvá, A., Cabezos, J., Soriano, A., Serre, N., Gómez i Prat, J., Pahissa, A., Molina, I., 2014. Trypanosoma cruzi infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. *Clin. Microbiol. Infect.* 20, 706–712. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12443>
- Schijman, A.G., 2018. Molecular diagnosis of Trypanosoma cruzi. *Acta Trop.* <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.02.019>
- Schijman, A.G., 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 441–449. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg338>
- Schijman, A.G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A.M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., others, 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 5, e931.
- Seiringer, P., Pritsch, M., Flores-Chavez, M., Marchisio, E., Helfrich, K., Mengele, C., Hohnerlein, S., Bretzel, G., Löscher, T., Hoelscher, M., Berens-Riha, N., 2017. Comparison of four PCR methods for efficient detection of Trypanosoma cruzi in routine diagnostics. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 88, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.04.003>
- Sguassero, Y., Cuesta, C.B., Roberts, K.N., Hicks, E., Comandé, D., Ciapponi, A., Sosa-Estani, S., 2015. Course of Chronic Trypanosoma cruzi Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. *PLoS ONE* 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139363>
- Silveira-Lacerda, E.P., Silva, A.G., Junior, S.F., Souza, M.A., Kesper, N., Botelho-Filho, A., Umezawa, E.S., 2004. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang.* 87, 204–207.
- Sosa-Estani, S., Cura, E., Velazquez, E., Yamptotis, C., Segura, E.L., 2009. Etiological treatment of young women infected with Trypanosoma cruzi, and prevention of congenital transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 484–487.
- Souza, R.M. de, Amato Neto, V., 2012. Discrepancies and consequences of indirect hemagglutination, indirect immunofluorescence and Elisa tests for the diagnosis of Chagas disease. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 54, 141–144. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652012000300005>
- Souza, W. de, 2009. Structural organization of Trypanosoma cruzi. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 89–100.
- Stanaway, J.D., Roth, G., 2015. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Glob. Heart* 10, 139–144.
- Strout, R.G., 1962. A Method for Concentrating Hemoflagellates. *J. Parasitol.* 48, 100. <https://doi.org/10.2307/3275421>
- Tanowitz, H.B., Kirchhoff, L.V., Simon, D., Morris, S.A., Weiss, L.M., Wittner, M., 1992. Chagas' disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 5, 400–419.
- Tarleton, R.L., Zhang, L., 1999. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol. Today* 15, 94–99.
- Thekiso, O.M.M., Kuboki, N., Nambota, A., Fujisaki, K., Sugimoto, C., Igarashi, I., Yasuda, J., Inoue, N., 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis. *Acta Trop.* 102, 182–189. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2007.05.004>
- Tibayrenc, M., 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int. J. Parasitol.* 28, 85–104.

- Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Coura, J.R., Levin, M.J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A.O., da Silveira, J.F., 2003. An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion (Paris)* 43, 91–97.
- Umezawa, E.S., Nascimento, M.S., Kesper, N., Coura, J.R., Borges-Pereira, J., Junqueira, A.C., Camargo, M.E., 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2143–2147.
- Vega Benedetti, A.F., Cimino, R.O., Cajal, P.S., Juarez, M.D.V., Villalpando, C.A., Gil, J.F., Marcipar, I.S., Krolewiecki, A.J., Nasser, J.R., 2013. Performance of different *Trypanosoma cruzi* antigens in the diagnosis of Chagas disease in patients with American cutaneous leishmaniasis from a co-endemic region in Argentina. *Trop. Med. Int. Health* 18, 1103–1109. <https://doi.org/10.1111/tmi.12144>
- Verani, J.R., Seitz, A., Gilman, R.H., LaFuente, C., Bern, C., 2009. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 80, 410–5.
- Viotti, R., Alarcón de Noya, B., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M.J., Guhl, F., López, M.C., Ramsey, J.M., Ribeiro, I., Schijman, A.G., Sosa-Estani, S., Torrico, F., Gascon, J., 2014. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58, 635–639. <https://doi.org/10.1128/AAC.01662-13>
- World Health Organization, 2002. Control of chagas disease: second report of the WHO Expert Committee, Control of Chagas disease. WHO, Geneva.
- Zarate-Blades, C.R., Bladés, N., Nascimento, M.S., da Silveira, J.F., Umezawa, E.S., 2007. Diagnostic performance of tests based on *Trypanosoma cruzi* excreted–secreted antigens in an endemic area for Chagas' disease in Bolivia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 57, 229–232. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.08.004>
- Zingales, B., Miles, M.A., Campbell, D.A., Tibayrenc, M., Macedo, A.M., Teixeira, M.M.G., Schijman, A.G., Llewellyn, M.S., Lages-Silva, E., Machado, C.R., Andrade, S.G., Sturm, N.R., 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect. Genet. Evol.* 12, 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- Zuniga, E., Motran, C., Montes, C.L., Diaz, F.L., Bocco, J.L., Gruppi, A., 2000. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: B cells undergo spontaneous apoptosis and lipopolysaccharide (LPS) arrests their proliferation during acute infection. *Clin. Exp. Immunol.* 119, 507–515.

