



UNIVERSIDAD DE MURCIA

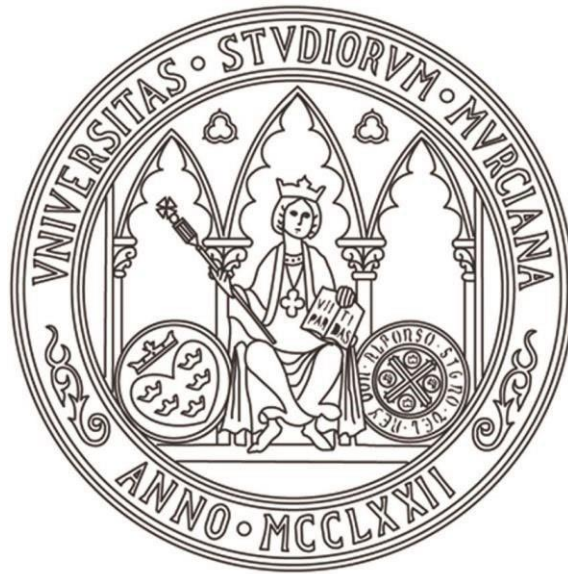
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Enfermedad de Chagas en una zona no endémica.
Evaluación de nuevas técnicas diagnósticas.

D. Luis Javier Gil-Gallardo Parras

2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

TESIS DOCTORAL

Enfermedad de Chagas en una zona no endémica.
Evaluación de nuevas técnicas diagnósticas.

Autor: D. Luis Javier Gil-Gallardo Parras

Directores: D. Manuel Segovia Hernández, y

Dña. M^a Asunción Iborra Bendicho



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Luis Javier Gil-Gallardo Parras

doctorando del Programa de Doctorado en

Ciencias de la Salud

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Enfermedad de Chagas en una zona no endémica. Evaluación de nuevas técnicas diagnósticas.

y dirigida por,

D./Dña. Manuel Segovia Hernández

D./Dña. M^a Asunción Iborra Bendicho

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 01 de febrero de 2023

Fdo.: Luis Javier Gil-Gallardo Parras

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1 c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

A mis abuelos, *in memoriam*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer al Dr. Manuel Segovia Hernández el haber confiado en mí para este proyecto y haberme despertado el espíritu investigador. Por todo lo que me ha enseñado en estos años.

También me gustaría dar las gracias a la Dra. M^a Asunción Iborra Bendicho, por su infinita paciencia, sus ánimos en los momentos de baja motivación y por haberme enseñado tanto durante todos estos años, tanto a nivel personal como profesional.

Me gustaría agradecer también la labor que han llevado a cabo el Dr. Bartolomé Carrilero y Fuensanta Franco en la batalla contra la Enfermedad de Chagas, ya que sin ellos todo el trabajo realizado en la Unidad de Medicina Tropical no hubiera sido posible.

Agradecer también la ayuda de todas las Técnicas de Laboratorio de Serología /Parásitos (Vicky, Santi, Encarna, María), por enseñarme a realizar las técnicas y las buenas prácticas de laboratorio.

A todos lo Facultativos y Técnicos de Laboratorio que forman parte del Servicio de Microbiología del HCUVA, por haberme ayudado a llegar a ser Microbiólogo y por sus enseñanzas.

A Cristina Vázquez, Marina Simón, Pablo Fernández, María Julia Pérez y Andrea Tureba, por haber compartido residencia y haberme enseñado muchas cosas los mayores y haberme apoyado los pequeños.

A los Jhonys (Javi, Kramer, Guille, JA, Rober y Davis) por haber hecho más amena tanto la residencia como el doctorado. Por ayudarme a desconectar en los momentos en los que lo necesitaba.

A Julia García Egea y Jose María García Cobacho, por haberme aguantado durante todos estos años.

A Lorena Lozano por su colaboración y por sus consejos.

A mis padres, por haberme enseñado casi todo lo que sé y haberme apoyado en todas las decisiones que he tomado, no puedo haber sido más afortunado.

A mi hermana, por haber cuidado siempre de mí, por escucharme y aconsejarme en todo momento.

RESUMEN

Introducción/objetivos: La falta de un estándar de oro para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (EC), así como la incorporación de nuevas herramientas diagnósticas (PCR, CMIA, ECLIA) hace que el diagnóstico de la EC, tanto en su fase aguda como en su fase crónica, no esté estandarizado. El objetivo de este trabajo es dilucidar la utilidad de las nuevas técnicas disponibles para el diagnóstico de la EC crónica y la EC congénita (ECC).

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio con un pool de sueros de pacientes con EC mediante CMIA durante 10 días consecutivos para monitorizar la calidad de los resultados obtenidos por la técnica, así como un ensayo con controles de calidad suministrados por el PNCQ y la OMS para la evaluación de diferentes técnicas serológicas (CMIA, IFI, ICT) en la detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Adicionalmente, se realizó un estudio comparativo entre CMIA e IFI con el fin de establecer una equivalencia entre ambas técnicas usando sueros de pacientes con EC. También se realizó un estudio con el objetivo de evaluar diferentes técnicas de biología molecular comerciales (RT-PCR) en la detección de ADN de *T. cruzi* tanto utilizando ADN purificado del parásito como muestras de pacientes con EC. Además, se evaluó la utilidad de la CMIA en el seguimiento del aclaramiento de anticuerpos de 82 recién nacidos de madre con EC hasta los 12 meses de vida. Por último, se realizó un estudio de coinfección de EC con *Strongyloides stercoralis* y se evaluó la utilidad del estudio de eosinofilia en el diagnóstico de infección por *S. stercoralis*, así como la utilidad de los ELISA en el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de estrongiloidiasis.

Resultados: Los resultados del control de calidad interno con gestión interna indican que la técnica de CMIA no posee errores aleatorios ni sistemáticos. El coeficiente de variación de las diferentes mediciones fue de 3,48%. En cuanto a los controles de calidad externos, las 3 técnicas estudiadas fueron capaces de

detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* en las muestras positivas y no obtuvieron ningún falso positivo en los sueros negativos. Se observó una equivalencia entre los títulos de anticuerpos medidos mediante IFI y determinados rangos de valores (S/CO) de CMIA. Por otro lado, todas las técnicas comerciales para la detección de ADN de *T. cruzi* fueron capaces de detectar hasta $1,9 \times 10^{-2}$ copias/ μ L de parásito y tuvieron buena concordancia con la PCR “*in house*” en muestras de pacientes con EC. En cuanto al estudio de aclaramiento de anticuerpos en el recién nacido de madre con EC, a los 9 meses el 81% de los niños eran seronegativos mediante CMIA y el 100% mediante IFI. A los 12 meses todos los niños sin ECC eran negativos mediante ambas técnicas. Por último, la sensibilidad y especificidad de la eosinofilia en el diagnóstico de estrongiloidiasis fue del 95,7 % y 61,1%, respectivamente, y se obtuvo una curación serológica de 70-80% al año de tratamiento con los ELISA empleados en el seguimiento postratamiento.

Conclusiones: La técnica de CMIA es robusta y carece de errores aleatorios o sistemáticos. El uso de controles de calidad externos confirma que las técnicas de CMIA, IFI e ICT son adecuadas para el diagnóstico serológico de EC. Las PCR comerciales son útiles para la detección de ADN de *T. cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*. La técnica de CMIA no es lineal, pero podemos establecer un título de anticuerpos mediante IFI para un rango determinado de valores de CMIA. La técnica de CMIA es útil en el seguimiento del aclaramiento de anticuerpos en niños sano nacidos de madre con EC. Los ELISA anti-*S. stercoralis* son de gran utilidad tanto para el diagnóstico de estrongiloidiasis como para el seguimiento postratamiento.

SUMMARY

Background: The lack of a gold standard for the serological diagnosis of Chagas disease (CD), as well as the development of new diagnostic tools (PCR, CMIA, ECLIA) challenges the standardization of the diagnosis of CD both in acute and chronic phase. The objective of this work is to evaluate the performance of the new techniques in the diagnosis of chronic CD and congenital CD (CCD).

Methods: A pool of sera from patients with CD was analyzed using CMIA for 10 consecutive days to monitor the quality of the results obtained by this technique over time. Different serological techniques (CMIA, IFI, ICT) were evaluated for the detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies using external quality assessment from the PNCQ and the WHO. A comparative study between CMIA and IFI was carried out in order to establish an equivalence between both techniques using sera from patients with CD. Several commercial molecular biology assays (RT-PCR) for the detection of *T. cruzi* DNA were evaluated, using *T. cruzi* purified DNA and samples from CD patients. In addition, the performance of CMIA for monitoring clearance of maternal antibodies was evaluated in a cohort of 82 newborns of mothers with CD in a 12-month follow-up study. Finally, the usefulness of eosinophilia in the diagnosis of *Strongyloides stercoralis* co-infection in CD patients, as well as the adequacy of ELISA in the diagnosis and follow-up of strongyloidiasis were assessed.

Results: The internal quality control results indicate that the CMIA technique lacks random or systematic errors (CV 3.48%). The external quality assessment attested the capability of the three techniques studied for the detection of anti-*T. cruzi* antibodies in the positive samples; false positives results were not obtained. An equivalence between the antibody titers measured by IFI and certain ranges of values (S/CO) of CMIA was observed. All the commercial assays evaluated for the detection of *T. cruzi* DNA were able to detect up to 1.9×10^{-2} copies/ μL of parasite and had good agreement with *in-house* PCR in samples from CD patients. Regarding the antibody clearance study in children born to mothers with

CD, 81% of children were seronegative by CMIA and 100% by IFI at 9 months of age. At 12 months of age, all children without CCD were negative by both techniques. Finally, the sensitivity and specificity of eosinophilia in the diagnosis of strongyloidiasis was 95.7% and 61.1%, respectively, and a serological cure of 70-80% was obtained by ELISA one year after treatment with ivermectin.

Conclusions: The CMIA technique is free of random or systematic errors. The use of external quality controls confirms that the CMIA, IFI and ICT techniques are adequate for the serological diagnosis of EC. Commercial PCR are useful for the detection of *T. cruzi* DNA both *in vitro* and *in vivo*. The CMIA technique is not linear, but an antibody titer could be establish using IFI for a certain range of CMIA values. The CMIA technique is useful in monitoring antibody clearance in healthy infants born to mothers with CD. The detection of anti-*S. stercoralis* by ELISA is valuable for the diagnosis of strongyloidiasis and for post-treatment follow-up.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1 Etiología de la enfermedad de Chagas	5
1.1 Taxonomía	5
1.2 Ciclo biológico.....	5
1.3 Ciclos epidemiológicos.....	7
1.4 Vías de transmisión.....	9
2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. Prevención y control.	13
2.1 Epidemiología en zona endémica	13
2.2 Epidemiología zona no endémica	15
2.3 Epidemiología molecular	18
2.4 Prevención y control	20
3 Patogenia y aspectos clínicos de la Enfermedad de Chagas.....	22
3.1 Patogenia.....	22
3.2 Fases de la enfermedad.....	23
3.3 Manifestaciones clínicas	26
3.4 Tratamiento.....	28
4 Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas	31
4.1 Diagnóstico parasitológico	33
4.2 Diagnóstico molecular	34
4.3 Diagnóstico serológico	37
4.4 Procedimientos diagnósticos de la Enfermedad de Chagas.....	41
5 Coinfección <i>Trypanosoma cruzi</i> con otros parásitos	43
5.1 <i>Strongyloides sp.</i>	43
5.2 <i>Toxocara sp.</i>	45
5.3 <i>Schistosoma sp.</i>	47
II. OBJETIVOS.....	49

III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1 Pacientes y muestras clínicas	55
1.1 Muestras empleadas para el Control de Calidad en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas.....	57
1.2 Muestras empleadas en el estudio de equivalencia entre el título de anticuerpos (IFI) y el valor índice (CMIA) de pacientes con ECC.....	59
1.3 Muestras empleadas en la evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas.....	60
1.4 Muestras empleadas en el estudio del aclaramiento de anticuerpos anti- <i>T. cruzi</i> en recién nacidos de madre con Enfermedad de Chagas.....	61
1.5 Muestras empleadas en el estudio de coinfección con diferentes parásitos en pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.....	62
1.6 Muestras empleadas en la evaluación de 2 técnicas ELISA comerciales para el diagnóstico y seguimiento de estrongiloidiasis.....	63
2 Diagnóstico microbiológico de la Enfermedad de Chagas	63
2.1 Técnicas parasitológicas	63
2.2 Técnicas serológicas	64
2.3 Técnicas moleculares para el diagnóstico de <i>T. cruzi</i> : Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	66
3 Diagnóstico de otras infecciones parasitarias.....	71
3.1 Enzimoinmunoensayo (ELISA).....	71
4 Tratamiento	74
5 Análisis estadístico	75
6 Consideraciones éticas	76
IV. RESULTADOS.....	77
1 Implementación de un Programa de Control de Calidad en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas	79
1.1 Control de calidad interno con gestión interna aplicado a la técnica de Quimioluminiscencia de Micropartículas (CMIA)	79

1.2	Control de calidad externo aplicado a diferentes técnicas serológicas (CMIA, IFI, ICT).....	81
2	Relación entre los títulos de IFI y los valores de CMIA para el seguimiento de la Enfermedad de Chagas	86
2.1	Determinación del rango de linealidad de la técnica de quimioluminiscencia (CMIA) en el ensayo Architect CHAGAS®	86
2.2	Determinación de la relación existente entre los valores S/CO obtenidos por CMIA y el título de anticuerpos mediante IFI	89
3	Evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas	92
3.1	Evaluación del Límite de Detección (LOD) de diferentes técnicas de biología molecular	92
3.2	Comparativa de diferentes técnicas de biología molecular (PCR) en muestras clínicas.....	97
3.3	Comparativa de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas congénita	105
4	Utilidad de la Quimioluminiscencia de micropartículas en el diagnóstico de Chagas congénito.	106
4.1	Aclaramiento de anticuerpos maternos en niños no infectados.....	107
4.2	Caso de transmisión congénita	110
5	Coinfección de pacientes de Chagas con otros parásitos.....	112
5.1	Coinfección de <i>T. cruzi</i> con <i>S. stercoralis</i>	114
5.2	Relación entre <i>S. stercoralis</i> y presencia de eosinofilia	116
5.3	Evaluación de 2 técnicas ELISA comerciales para el diagnóstico y seguimiento de estrongiloidiasis.....	119
V.	DISCUSIÓN.....	125
1	Implementación de un Programa de Control de Calidad en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas	128
2	Relación entre los títulos de IFI y los valores de CMIA para el seguimiento de la Enfermedad de Chagas	134

3	Evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas	138
4	Utilidad de la Quimioluminiscencia de micropartículas en el diagnóstico de Chagas congénito	142
5	Coinfección de pacientes de Chagas con otros parásitos.....	146
VI.	CONCLUSIONES.....	153
VII.	BIBLIOGRAFÍA	157

I. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una antropozoonosis parasitaria producida por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta enfermedad originaria de América del Sur fue descrita en el año 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (Figura 1).

Carlos Chagas nació el 9 de julio de 1879 en Minas Gerais, Brasil. Hijo de Mariana Cândida Chagas y José Justiniano das Chagas, Carlos se matriculó en la escuela de ingeniería minera en Ouro Preto, aunque posteriormente acabaría estudiando medicina en Río de Janeiro influenciado por su tío, Carlos Ribeiro de Castro, el cual era dueño de un hospital en la capital brasileña. Carlos terminó sus estudios en 1902.

Ya en la facultad llamó la atención del Dr. Oswaldo Cruz, director del nuevo instituto Seroterápico Federal, el cual le invitó a trabajar en el mismo al terminar sus estudios. El instituto Seroterápico Federal, el cual se conocería posteriormente con el nombre de Instituto Oswaldo Cruz, fue creado en 1900 y situado en un suburbio de Río de Janeiro (capital de la República brasileña por aquel entonces) con el objetivo de impulsar la investigación, educación y producción científica del país.

Carlos obtuvo su doctorado al año siguiente gracias a su trabajo sobre la hematología de la malaria y después de un período en el que estuvo trabajando como médico de medicina interna en el interior, se unió finalmente al instituto Oswaldo Cruz en 1905 por razones económicas. En 1907 fue enviado al noreste del país para realizar una campaña antipalúdica en los trabajos del ferrocarril que se estaban realizando en el estado de Minas Gerais. El Dr. Chagas se estableció en un vagón de ferrocarril y en el transcurso de su trabajo identificó a un insecto hematófago, denominado comúnmente como “barbeiro”, descubriendo parásitos con caracteres morfológicos de tripanosoma en su cloaca, que posteriormente se identificaron como *Trypanosoma minasense*. En 1908 presentó estos hallazgos a su maestro Oswaldo Cruz e inocularon a un mono tití con estos parásitos, observando al mes tripanosomas en la sangre del simio. Repitieron la acción con otros animales como cobayas, conejos y perros obteniendo el mismo resultado y confirmando así la relación entre el parásito y la enfermedad infecciosa.

En enero de 1909, el Dr. Chagas fue consultado por el cuadro febril de una niña de 2 años que cursaba con visceromegalia y adenomegalias, encontrando tanto en su sangre como en la de su gato una nueva especie de tripanosoma a la que denominó *Trypanosoma cruzi* en honor a su mentor.

Carlos fue capaz de reproducir con éxito la infección de manera experimental, describiendo su etiología, patología, rasgos clínicos y epidemiología. La nueva enfermedad pasaría a conocerse como enfermedad de Chagas en un breve periodo de tiempo gracias a la sugerencia del médico Miguel Couto, miembro titular de la academia nacional de medicina desde 1886 y posteriormente presidente en 1914.

Carlos Chagas se convirtió en 1910 en miembro de la Academia Brasileña de Medicina y fue nombrado director del Instituto Oswaldo Cruz tras la muerte de su mentor en 1917.



Figura 1. Carlos Chagas en su laboratorio del instituto Oswaldo Cruz (Río de Janeiro, Brasil) Fuente: Organización Mundial de la Salud (OMS) Disponible en: <https://www.who.int/bulletin/volumes/87/7/09-030709/es/>

1 Etiología de la enfermedad de Chagas

1.1 Taxonomía

La enfermedad de Chagas está producida por el parásito hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). *T. cruzi* pertenece al subphylum *Mastigophora* del phylum *Sarcomastigophora*, orden *kinetoplastida*, caracterizados por poseer flagelo y un orgánulo denominado kinetoplasto, el cual contiene ADN. Pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, del suborden *Trypanosomatina*, que comprende organismos con un flagelo atado al cuerpo por una membrana ondulante y son parásitos obligados (Brenner, 1973; Levine *et al.*, 1980). *T. cruzi* se incluye en la sección estercoraria, grupo en el que se engloban los tripanosomas cuyo estadio infeccioso se desarrolla en el tracto digestivo del vector y se transmite a los hospedadores mamíferos a través de las heces.

1.2 Ciclo biológico

En áreas endémicas, la transmisión de *T. cruzi* se produce en más del 80% de los casos mediante la picadura de insectos de la familia *Reduviidae*, insectos hematófagos que participan en el mecanismo vectorial de la EC.

El ciclo de vida de *T. cruzi* es un ciclo de vida complejo, desde la infección del hospedador vertebrado a la ingesta del tripanosoma por los insectos vectores y su posterior transmisión a un nuevo hospedador vertebrado (Figura 2). El parásito posee 3 principales estadios morfológicos: amastigote, epimastigote y tripomastigote; los cuales se diferencian en la presencia o no de flagelo y en la posición del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brenner, 1973). Así, la forma amastigote no posee flagelo y las formas epimastigote y tripomastigote poseen un flagelo unido al cuerpo. El ciclo comienza cuando el triatoma se alimenta de sangre de un vertebrado, la cual contiene tripomastigotes (slender y broad) y amastigotes en proporción 9:1. Los tripomastigotes se convierten en amastigotes pasando de forma slender a broad y, posteriormente, los amastigotes comienzan a hincharse y extender el flagelo hasta transformarse en epimastigotes. Esta forma intermedia entre amastigote y epimastigote es conocida como esferomastigote. Posteriormente, y ya en el intestino grueso del vector, los

epimastigotes se adhieren hidrofóticamente a la pared antes de diferenciarse en tripomastigotes metacíclicos (forma infectiva) (Kleffmann *et al.*, 1998). Cuando el vector se alimenta de la sangre del hospedador vertebrado, expulsa los tripomastigotes metacíclicos en las heces y éstos alcanzan el torrente sanguíneo a través de la herida de la picadura. Una vez en sangre, los tripomastigotes infectan una gran variedad de tipos celulares (macrófagos, células del sistema nervioso, fibroblastos y miocitos) (Burleigh y Andrews, 1995). En el interior de las células, los tripomastigotes se transforman en amastigotes, los cuales comenzarán a multiplicarse formando pseudoquistes intracelulares. Posteriormente, estos amastigotes se convierten en tripomastigotes, pasando por varias formas intermedias entre las que se encuentran algunas con morfología de epimastigote. Una vez formados, los tripomastigotes escapan del pseudoquiste a la sangre y al sistema linfático como formas slender, las cuales pueden invadir nuevas células siguiendo el mecanismo descrito para los tripomastigotes metacíclicos. Tanto la invasión de nuevas células, así como la replicación intracelular van a ser pasos esenciales para el establecimiento de la enfermedad. Por último, las formas slender que fracasan al invadir nuevas células, experimentan cambios morfológicos, primero en formas broad y posteriormente en amastigotes (Tyler y Engman, 2001).

Triatoma brasiliensis en Brasil, *Rhodnius pallescens* en Colombia y Panamá y *Triatoma pallidipennis* en Méjico. Aunque la mayoría de las infecciones que se producen en este ciclo son vectoriales, los mamíferos también pueden adquirir la infección mediante la ingesta de triatominos infectados.

Ciclo peridoméstico. Es el que sirve de unión entre el ciclo selvático y el doméstico. Intervienen en él una gran cantidad de mamíferos (marsupiales, roedores, perros) que habitan tanto en el interior como en el exterior de las viviendas, y triatominos selváticos que son atraídos hacia las casas por el alimento.

Ciclo doméstico. Las malas condiciones de las viviendas (casas con paredes de adobe, grietas, techos de paja), así como la presencia de animales domésticos que conviven con el ser humano (perros, gatos, roedores) permite el contacto estrecho entre los vectores triatominos y el ser humano. Las principales especies de vectores que participan en este ciclo son *Triatoma infestans* en los países del Cono Sur (Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay), *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* en los países andinos y centroamericanos, y *Triatoma barberi* en México (Figura 3).

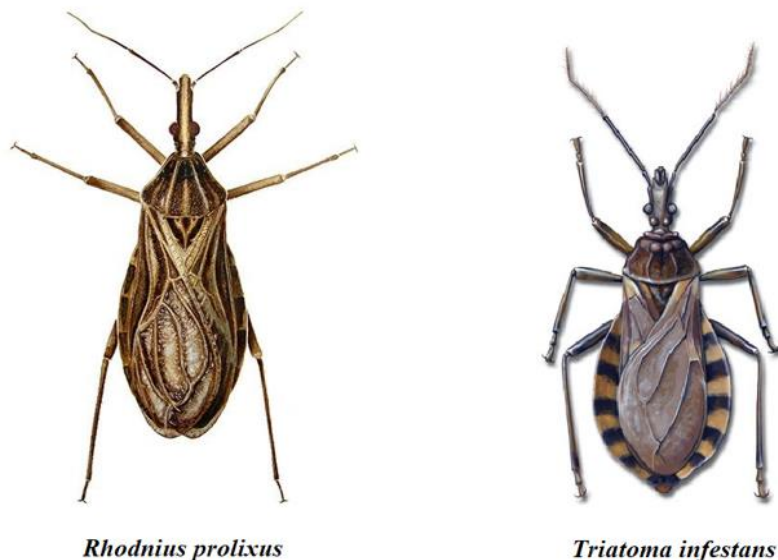


Figura 3. Principales especies de vectores de la enfermedad de Chagas en el ciclo doméstico.

1.4 Vías de transmisión

Transmisión vectorial

La transmisión vectorial es exclusiva del continente americano, donde es la vía mayoritaria de transmisión. Alrededor del 80% de las infecciones producidas en área endémica se deben a la transmisión vectorial (Vazquez-Prokopec *et al.*, 2009). Se conocen más de 130 especies de triatominos en la naturaleza, aunque sólo unos cuantos son vectores competentes para *T. cruzi* (Lent y Wygodzinsky, 1979; Schofield y Galvão, 2009). Las tres especies más importantes que son capaces de transmitir la enfermedad al hombre son *Rhodnius prolixus*, *Triatoma infestans* y *Triatoma diminuta*. (OMS, 2002). La transmisión se produce a través de las heces que el vector deposita mientras se alimenta de la sangre del hospedador. Posteriormente, la entrada del parásito se produce a través de laceraciones en la piel (herida de la picadura) o de mucosas. Entre los hospedadores se encuentran, además del ser humano, 150 especies de mamíferos, principalmente marsupiales, roedores y armadillos en el ciclo selvático y perros, gatos y pequeños roedores que forman parte del ciclo doméstico.

Transmisión congénita

La primera transmisión congénita documentada fue la observada por Carlos Chagas en 1911. El Dr. Chagas describió el caso de dos recién nacidos de madres con EC que presentaron convulsiones al nacer y acabaron falleciendo a los 6 y 8 días de vida. Posteriormente, se halló la presencia de *T. cruzi* en sus autopsias (Chagas, 1911).

Aunque la vía de transmisión congénita es minoritaria en zona endémica, constituye la principal vía de transmisión de la EC en áreas no endémicas, por encima de los trasplantes de órganos y las transfusiones sanguíneas (Carlier y Truyens, 2015).

En el cono sur de los países de Latinoamérica, los estudios realizados sitúan la tasa de transmisión congénita entre el 1 y el 12% (Azogue y Darras, 1991; Basombrio *et al.*, 1999; Salas *et al.*, 2007). Esta variabilidad podría ser debida a la dificultad de diferenciar entre transmisión vertical y transmisión

vectorial en el primer año de vida, ya que sólo entre el 10% y el 25% de los neonatos infectados desarrollan manifestaciones clínicas (Torrico *et al.*, 2004). Sin embargo, los estudios realizados en área no endémica, en la que el vector no está presente, establecen el riesgo de transmisión congénita entre el 2% y el 7% (Howard *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2020; Simón *et al.*, 2019).

El principal factor de riesgo asociado a la transmisión congénita es la presencia de parasitemia en el embarazo, detectada por PCR o microhematocrito, debido a la disminución de la respuesta inmune en la embarazada (Brutus *et al.*, 2010; Bua *et al.*, 2012; Hermann *et al.*, 2004; Murcia *et al.*, 2013; Virreira *et al.*, 2007) y la baja respuesta inmune generada en el neonato (Carlier y Truyens, 2015). Se han considerado además otros factores de riesgo como la carga parasitaria (Bern y Montgomery, 2009; Bua *et al.*, 2012) o el linaje de *T. cruzi* implicado en la transmisión vertical (García *et al.*, 2014; Ortiz *et al.*, 2012), pero aún falta evidencia científica.

La transmisión materno-fetal puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección así como en sucesivos embarazos, por lo que debe sospecharse en cualquier niño nacido de madre con EC (Freilij y Altchek, 1995; Torrico *et al.*, 2004). La vía hematogena transplacentaria se postula como el mecanismo más probable de transmisión congénita (Carlier y Truyens, 2015).

Se ha postulado también la posible transmisión vertical a través de la leche materna, sin embargo, no existen estudios que puedan confirmar esta vía sin descartar otras posibilidades como la presencia de grietas en los pezones, contaminación con sangre infectada o la misma vía de transmisión vertical (Medina-Lopes, 1988; Norman y López-Vélez, 2013; Rassi *et al.*, 2004).

Transmisión transfusional

La transmisión por transfusión sanguínea fue documentada por primera vez en 1952 (Morel, 1999; Pedreira De Freitas *et al.*, 1952), aunque la existencia de esta vía de transmisión ya fue propuesta por Salvador Mazza en 1936 (Wendel, 1998). En los países endémicos, la vía transfusional ha supuesto aproximadamente el 10% de las infecciones por *T. cruzi*, la segunda vía de transmisión más importante por detrás de la transmisión vectorial.

Una vez realizada la transfusión de sangre completa o hemoderivados, el riesgo de adquirir la enfermedad varía entre 10-25% (Bern *et al.*, 2008; Schmunis, 1999).

En España, hay casos documentados de transmisión transfusional en los años 1984, 1995 y 2004 (Angheben *et al.*, 2015). Estos casos y la identificación de donantes de sangre positivos contribuyeron a la regulación de las transfusiones en el año 2005 mediante el Real Decreto 1088/2005; este decreto obliga a los centros de transfusión a realizar un estudio serológico a cualquier donante nacido en zona endémica, hijo de madre nacida en zona endémica o que haya sido transfundido en países endémicos. Gracias a esta medida, desde 2005 sólo se han notificado 3 casos de infección por *T. cruzi* post-transfusional (Flores-Chávez *et al.*, 2008; Pérez de Pedro *et al.*, 2008).

Transmisión por órganos trasplantados

La transmisión de la EC mediante trasplante de órgano sólido también ha sido documentada. Los órganos de un individuo con EC pueden contener formas amastigotes del parásito que en receptores inmunocomprometidos pueden evolucionar a formas tripomastigotes. Se han descrito 19 casos en zona endémica: 13 renales, 3 hepáticos, 2 cardíacos y 1 reno-pancreático (Barcán *et al.*, 2005; Chocair *et al.*, 1981; Kun *et al.*, 2009; Riarte *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2008).

En España, la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) obliga desde 2004 a realizar un cribado a todo donante nacido o residente en zona endémica. En dicho documento se establece que la infección en fase aguda contraindica cualquier tipo de trasplante, y en el caso de fase crónica el trasplante de corazón está contraindicado; sin embargo se ha realizado algún trasplante renal observándose una tasa de transmisión del 35% (Len y Pahissa, 2007).

Además, el 14 de marzo de 2008 se publicó el Plan Nacional de Sangre de Cordón, donde se recogen las mismas recomendaciones que en el caso de la transfusión sanguínea para todo potencial donante.

Transmisión accidental

Se trata de la vía de transmisión más infrecuente de todas. Se produce de manera esporádica por aerosoles generados tras centrifugar muestras contaminadas, a través de la vía conjuntival, o por pinchazo accidental con agujas infectadas (Herwaldt, 2001).

Transmisión oral

Aunque entre los años 1930 y 1950 ya se había postulado la vía oral como un posible mecanismo de transmisión en animales silvestres a través de la ingesta de deyecciones de triatomino, no fue hasta el año 1982 que se demostró, experimentalmente en ratas, que este mecanismo era viable. Los primeros casos documentados ocurrieron en los años 1965 y 1986, en los que 17 y 26 pacientes respectivamente se infectaron de manera simultánea. Presumiblemente, el brote de 1965 se produjo por consumo de vegetales contaminados con heces de marsupiales infectados, y por consumo de jugo de caña contaminada con heces de triatomino en el caso del brote de 1986 (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012; Toso M *et al.*, 2011).

La transmisión se produce por ingestión de triatominos infectados, ingestión de alimentos contaminados con sus heces o por la ingestión de mamíferos infectados (Toso M *et al.*, 2011).

Desde entonces, se han ido identificando brotes de EC vía oral en países como Brasil, Venezuela y Colombia (Alarcón de Noya *et al.*, 2016; Ríos *et al.*, 2011), siendo el más importante el ocurrido en 2010 en una escuela de Caracas, el cual afectó a más de 100 personas entre profesores y estudiantes y fue atribuido al zumo de guayaba que preparaban localmente (Alarcón de Noya *et al.*, 2016).

Esta vía de transmisión se caracteriza por una gran morbilidad y una mayor mortalidad. Además, posee diferentes características epidemiológicas con respecto a la transmisión vectorial: ocurre en zonas de baja endemia, ya sean urbanas o rurales, donde no hay vectores domiciliados y se producen en forma de pequeños brotes agudos (Díaz y González, 2014).

2 Epidemiología de la Enfermedad de Chagas. Prevención y control.

Se estima que existen actualmente entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, fundamentalmente en América latina, y más de 25 millones de personas en riesgo de contraer la EC (OMS, 2015). La epidemiología global de la enfermedad representa la suma de la transmisión vectorial en zona endémica más los movimientos migratorios que se han producido a gran escala en los últimos años, tanto de las zonas rurales a las urbanas como a las zonas no endémicas (Europa, Australia y Norteamérica principalmente) (Bern, 2015).

2.1 Epidemiología en zona endémica

La EC es endémica en 21 países de América latina (Tabla 1). Se extiende desde la latitud 42°N (Sur de Estados Unidos) a la latitud 46°S (Sur de Chile y Argentina). Tradicionalmente, la enfermedad ha estado confinada a las áreas rurales y pobres de América Central y Sudamérica, donde la transmisión vectorial es la principal ruta de contagio. Los residentes de las casas infestadas están continuamente expuestos a la picadura y las heces del vector, lo que aumenta la probabilidad de infectarse (la probabilidad de adquirir la infección después de la picadura es de aproximadamente un 1%) (Rabinovich *et al.*, 1990).

Tabla 1. Países donde la EC es endémica.

Argentina	Ecuador	Nicaragua
Belize	El Salvador	Panamá
Bolivia	Guatemala	Paraguay
Brasil	Guyana	Perú
Chile*	Guyana Francesa	Surinam
Colombia	Honduras	Uruguay*
Costa Rica	Méjico	Venezuela

*Países donde se ha conseguido interrumpir la transmisión vectorial.

La EC es extremadamente variable entre los diferentes países de Latinoamérica y también dentro de ellos. La prevalencia de la EC en países

endémicos ha disminuido en las últimas décadas gracias a los programas de control realizados en Latinoamérica (Tabla 2 y Figura 4). El país con la prevalencia de Chagas más elevada es Bolivia, con una prevalencia estimada de 6,8%, alcanzando valores de cerca del 50% en algunas zonas hiperendémicas como Tarija. Uruguay y Perú son los países con menor prevalencia (0,2% y 0,4% respectivamente) (Alonso-Vega *et al.*, 2013).

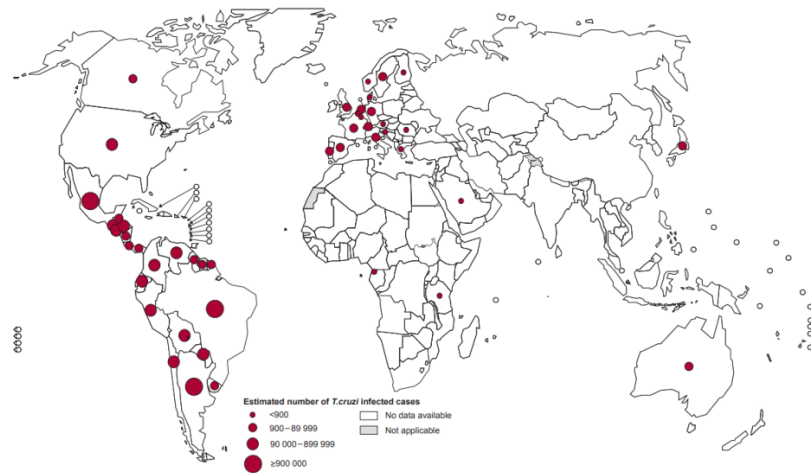


Figura 4. Distribución de casos de EC, basado en estimaciones oficiales (OMS, 2018).

Tabla 2. Prevalencia de infección por *T. cruzi* en países endémicos en los años 1980 y 2010 (Lidani *et al.*, 2019).

País	Prevalencia en 1980	Prevalencia en 2010
Argentina	10%	3,6%
Bolivia	24%	6,1%
Brasil	4,2%	0,6%
Chile	16,9%	0,7%
Paraguay	21,4%	2,1%
Uruguay	3,4%	0,2%
Colombia	30%	0,9%
Ecuador	10,7%	1,4%
Perú	9,8%	0,4%
Venezuela	3%	0,7%
Costa Rica	11,7%	0,16%
El Salvador	20%	1,3%
Guatemala	16,6%	1,2%
Honduras	15,2%	3,1%
Panamá	17,7%	5,2%
México	6,8%	0,8%

En cuanto a datos obtenidos en la última década, un meta-análisis realizado entre 2010 y 2019 en mujeres embarazadas provenientes de zona endémica establece la prevalencia de EC en el continente americano en el 9%, aumentando a un 12% en Latinoamérica. Bolivia es el país con la mayor prevalencia (29%), seguido de Paraguay y Argentina (9%). La prevalencia en América Central es del 4% y, por último, la prevalencia en Norteamérica se sitúa en torno al 2% (Santana *et al.*, 2020).

2.2 Epidemiología zona no endémica

Los movimientos poblacionales de los últimos años hacia zonas no endémicas han llevado a la exportación de casos de EC a países europeos (España, Italia, Alemania, Francia, Suiza), Estados Unidos, Australia o Japón (Figura 5).

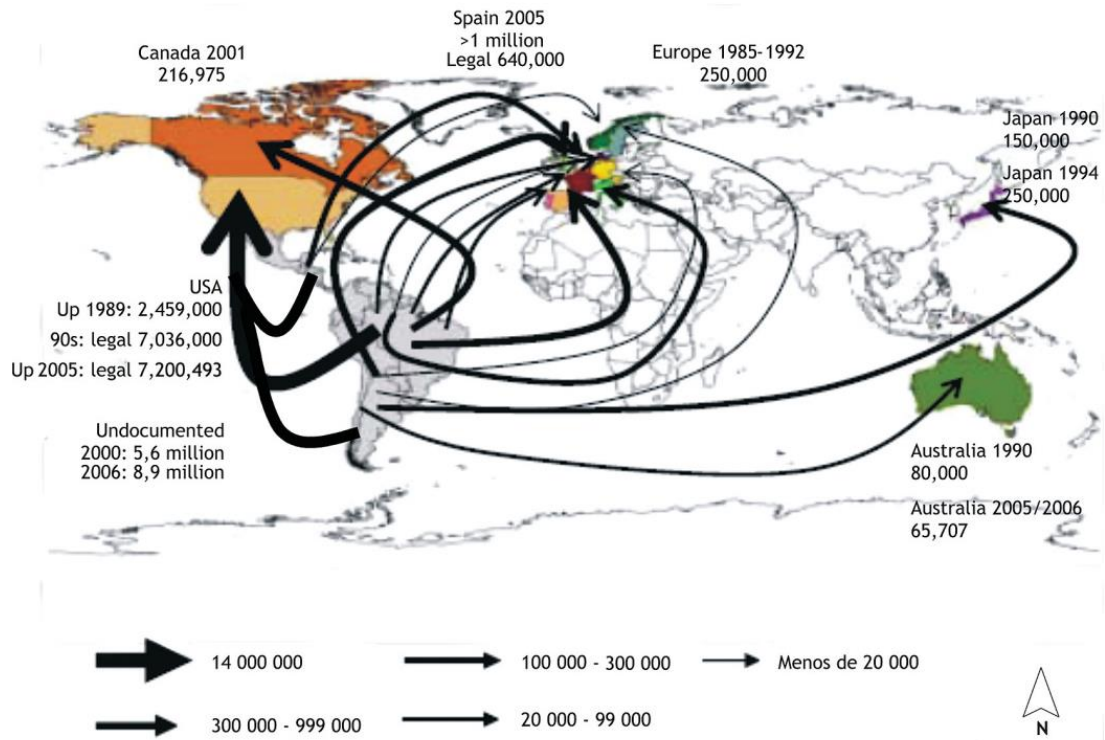


Figura 5. Flujo de inmigrantes desde Latinoamérica a Japón, Australia, Europa y Estado Unidos. Fuente: Centro Latino Americano y Caribeño de Demografía (Adaptado de Schmunis y col., 2007).

En Estados Unidos, se estima que viven alrededor de 22 millones de personas nacidas en zona endémica, con una cifra de infectados que asciende a 300.000 personas (Basile *et al.*, 2011; Monge-Maillo y López-Vélez, 2017).

Se calcula que en Europa habitan más de 5 millones de inmigrantes provenientes de zona endémica de los que entre 80.000 y 120.000 padecen la EC (Figura 6). Bolivia es el país que más contribuye a estos datos, con un 56,4% de los infectados por *T. cruzi*, seguido de Ecuador con un 11,2% y Argentina con un 10,4% (Lidani *et al.*, 2019). A pesar de estos datos, hasta el año 2009 sólo se habían confirmado 4.290 casos en Europa, por lo que el 94-96% de los casos seguirían aún sin diagnosticarse (Lidani *et al.*, 2019).



Figura 6. Número estimado de inmigrantes con EC que viven en países no endémicos (Rassi *et al.*, 2010).

Entre los países europeos que más inmigrantes Latinoamericanos han recibido en los últimos años encontramos a España. La población Latinoamericana ha ido aumentando desde el año 1998, disminuyó entre el año 2008-2016 y actualmente se sitúa en 1.123.517 (Figura 7). Se estima en más de 50.000 personas las infectadas por *T. cruzi* en el año 2010, de las cuales un 60% son mujeres en edad fértil (Navarro *et al.*, 2012).

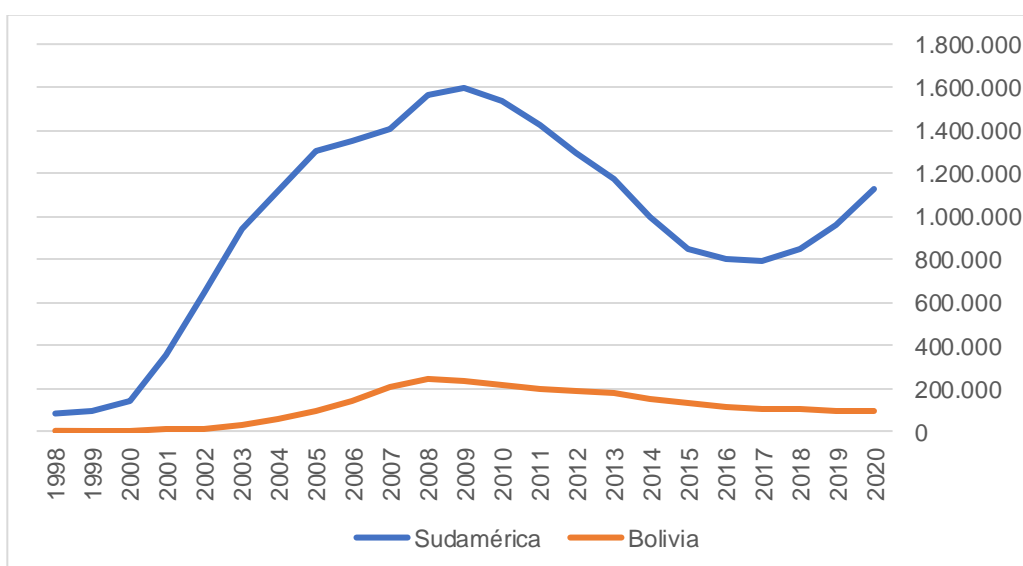


Figura 7. Cambios en la población latinoamericana y boliviana entre 1998 y 2020 en España. Fuente: Instituto Nacional de Estadística

Se han realizado varios estudios epidemiológicos en mujeres embarazadas en España. Así en Madrid, la prevalencia entre gestantes latinoamericanas fue del 3,2%, siendo el 85% de las embarazadas con serología positiva bolivianas (Francisco-González *et al.*, 2018). En la Comunidad Valenciana, se obtuvo una prevalencia del 3% en embarazadas en un estudio realizado en Alicante (Ramos *et al.*, 2014), mientras que en Barcelona, en un estudio realizado entre 2010 y 2015, la prevalencia de embarazadas latinoamericanas con infección por *T. cruzi* fue del 2,8%, siendo del 15,7% en bolivianas (Basile *et al.*, 2019).

2.3 Epidemiología molecular

T. cruzi es una especie genéticamente heterogénea que se caracteriza por poseer una gran variabilidad en sus características bioquímicas y biológicas, distribución y ciclo epidemiológico predominante (Campbell *et al.*, 2004; Miles *et al.*, 2003).

En 1999 se estableció un primer consenso sobre la nomenclatura de los diferentes linajes de *T. cruzi*, dividiéndolos en 2 linajes genéticos distintos TcI y TcII. A su vez, TcII se subdividió en 5 subgrupos: TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe (Souto *et al.*, 1996). Posteriormente, en 2009, se llegó a un nuevo consenso en el que se definieron 6 linajes genéticos distintos, conocidos como unidades discretas de tipificación (DTUs [TcI a TcVI]). Así TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe se renombraron como TcII, TcIII, TcIV, TcV y TcVI respectivamente (Zingales *et al.*, 2009). En los últimos años se ha descubierto un potencial séptimo linaje en el centro y norte de Sudamérica asociado a los murciélagos (TcBat), relacionado estrechamente con TcI (Messenger y Miles, 2015; Pinto *et al.*, 2015).

TcI es el más abundante y ampliamente distribuido de todos los DTUs en América. Se relaciona tanto con el ciclo selvático como con el ciclo doméstico. En humanos se concentra en el norte de América central y Sudamérica, y está asociado con cardiomiopatía chagásica (Roellig *et al.*, 2008). TcII se encuentra predominantemente en el sur y en las regiones centrales de Sudamérica y se asocia principalmente al ciclo doméstico. Se asocia además con manifestaciones cardíacas concomitantemente con megaesófago o megacolon (Fernandes *et al.*,

1999). TcIII se asocia con el ciclo selvático en Brasil y en los países adyacentes, con escasas infecciones en humanos documentadas. Su principal reservorio es el armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Llewellyn *et al.*, 2009). TcIV muestra un patrón de distribución similar al de TcIII, sin embargo, su participación en el ciclo doméstico es muy frecuente y es el segundo linaje mayoritario de EC en Venezuela (Miles *et al.*, 1981). TcV y TcVI son dos híbridos procedentes de TcII/TcIII que están fuertemente asociados a ciclos domésticos en el Cono Sur en pacientes cardiopatas, en casos de megaesófago y megacolon (Lewis *et al.*, 2011).

En la figura 8 se puede observar la distribución geográfica de las diferentes DTUs y su correspondencia con los ciclos domésticos y selváticos.

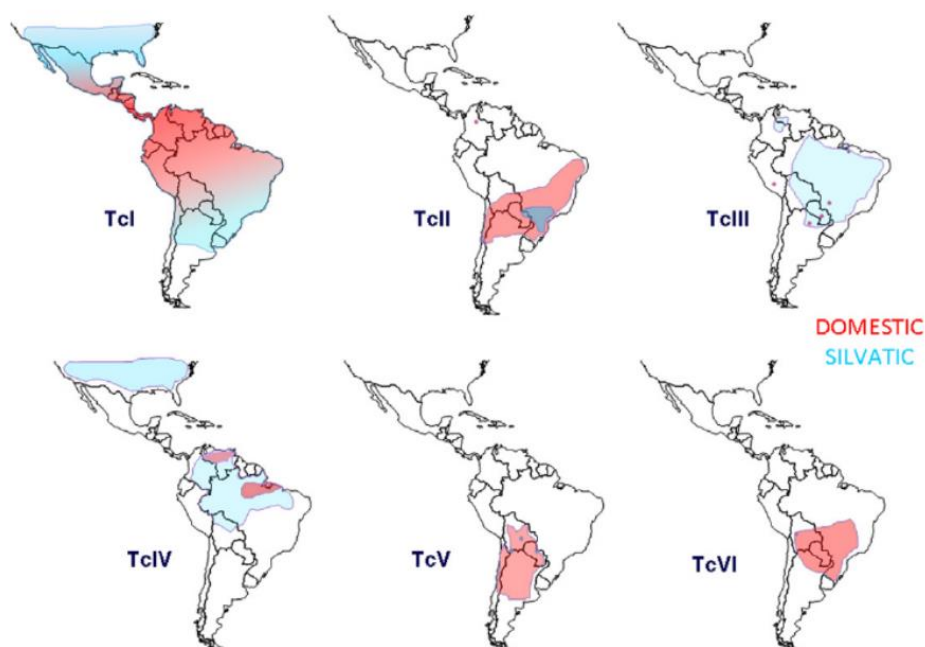


Figura 8. Distribución geográfica de las diferentes DTUs en Latinoamérica. Las DTUs relacionadas con los ciclos domésticos aparecen representadas en color rojo y las relacionadas con los ciclos selváticos en color azul (Zingales *et al.*, 2012).

Por último, también se han realizado estudios con el fin de asociar el genotipo con la transmisión vertical de *T. cruzi*. Exceptuando el TcIV, todos los demás linajes se han identificado en infecciones congénitas, siendo el linaje TcV el responsable del 80-100% de los casos de Chagas congénito en Argentina, Chile, Bolivia, sur de Brasil y Paraguay. Los genotipos TcII y TcVI han sido

identificados en neonatos de Argentina, Brasil, Bolivia y Chile, mientras que TcIII ha sido identificado en casos congénitos en Paraguay y TcI en Argentina, Chile y Colombia (Carlier y Truyens, 2015; Puerto *et al.*, 2010; Virreira *et al.*, 2007).

2.4 Prevención y control

La ECes una zoonosis, por tanto, su erradicación es imposible debido a la cantidad de reservorios animales que existen.

El tratamiento farmacológico del que se dispone en la actualidad (Benznidazol y Nifurtimox) no es eficaz para curar la enfermedad una vez que el parásito se ha instaurado en los tejidos, por lo que el control de la transmisión de la enfermedad se basa fundamentalmente en evitar cualquier vía de contagio de la infección.

En un principio, las campañas de prevención y control de la EC se centraron en evitar la transmisión vectorial en zona endémica mediante la disminución del número de triatominos que cohabitan con los seres humanos, con campañas de concienciación en zonas rurales y mejora de las condiciones de las viviendas.

Así, debido a los altos índice de morbimortalidad descritos para la infección por *T. cruzi*, se empezaron a desarrollar diferentes iniciativas de control de los vectores en los países endémicos. El éxito de las campañas de fumigación realizadas en Brasil, Chile, Venezuela y Argentina en los años 70 (Dias *et al.*, 2002) animó a que surgieran diferentes iniciativas subregionales:

- INCOSUR (1991): Iniciativa de los países del Cono Sur formada por Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay.
- IPA (1997): Iniciativa de los países Andinos en la que participaron Ecuador, Colombia, Perú y Venezuela.
- IPCA (1997): Iniciativa de los países de Centro América formada por El Salvador, Guatemala, Honduras, Costa Rica, Méjico y Nicaragua.
- AMCHA (2004): Iniciativa del Amazonas, formada por Perú, Colombia, Brasil, Bolivia, Ecuador, Venezuela, Guyana y Surinam.

El objetivo de estas campañas fue disminuir la principal vía de transmisión mediante la fumigación de las viviendas con piretroides, vigilancia de posibles reinfestaciones por triatominos, concienciación de la población con campañas sobre la importancia de evitar la infección y por último el control de los centros de transfusiones para eliminar la vía transfusional. Estas actuaciones consiguieron eliminar la transmisión vectorial en países como Chile y Uruguay, así como en amplias partes de Argentina y Brasil, disminuyendo las zonas endémicas a las observadas en la figura 9.



Figura 9. Mapa de la transmisión vectorial de la enfermedad de Chagas en 2014. Fuente: Organización Panamericana de Salud (PAHO).

La disminución de la transmisión vectorial, la concienciación de los ciudadanos, así como el control a nivel transfusional de la EC ha conseguido disminuir tanto la prevalencia como la incidencia de la enfermedad en Latinoamérica. En la tabla 3 se puede observar la evolución del número total de infectados y de nuevos casos por año entre los años 1980 y 2010.

Aunque se ha avanzado mucho en el control del vector en zona endémica, la escasez de tratamientos eficaces para curar la enfermedad, así como la gran morbimortalidad de los pacientes ya infectados, requieren de nuevas campañas enfocadas en el estudio de nuevas moléculas capaces de eliminar por completo el parásito y de mayor conocimiento de la fisiopatogenia de la enfermedad.

Tabla 3. Evolución de la prevalencia e incidencia de infección por *T. cruzi* en Latinoamérica de 1980 a 2010 (Pérez-Molina y Molina, 2018).

	1980-85	2005	2010
Población en riesgo (% total)	92. 895. 000 (25%)	108. 595. 000 (20,4%)	70. 199. 360 (12,9%)
Número de infectados	17. 395. 000	7. 694. 500	5. 742. 167
Número de nuevos casos por año	700. 000	55. 585	38. 593
Transmisión congénita	7.000 – 49. 000	14. 385	8.668
Transmisión vectorial	No datos	41. 200	29. 925
Mortalidad anual	>45. 000	12. 500	12. 000

3 Patogenia y aspectos clínicos de la Enfermedad de Chagas

3.1 Patogenia

Existen dos teorías capaces de explicar las lesiones tisulares producidas en pacientes con EC: la autoinmunidad y la persistencia del parásito en los tejidos (Teixeira *et al.*, 2011).

En un primer momento, la aparición tardía de las lesiones tisulares en relación con la infección aguda, así como la ausencia del parásito en los tejidos (sobre todo en los lugares de intensa inflamación), condujeron a postular que la

patología observada en la fase crónica era producida a través de una respuesta inmunitaria contra antígenos propios del huésped (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Esta teoría surgió en la década de 1990, cuando se evidenció que algunas proteínas de *T. cruzi* (proteínas ribosomales y otros antígenos) tenían reacción cruzada con varias proteínas humanas como la miosina cardíaca, proteínas del tejido neuronal, antígenos linfocitarios, proteínas ribosomales y antígenos musculares (Kierszenbaum *et al.*, 1999; Leon y Engman, 2001).

Actualmente, a raíz de los estudios realizados en biopsias endomiocárdicas, así como al desarrollo de técnicas más sensibles (inmunohistoquímica y PCR), se ha podido demostrar la persistencia tanto de antígenos como de formas amastigotes de *T. cruzi* en infiltrados inflamatorios de lesiones cardíacas en pacientes con EC cardíaca. Estos antígenos serían los responsables de desencadenar una respuesta de hipersensibilidad mediada por células T específicas que conduciría al daño tisular en el huésped (Nagajothi *et al.*, 2012). Este hallazgo, junto con la demostración de la eficacia del tratamiento en la eliminación del parásito y la reducción de la gravedad de la enfermedad (Villar *et al.*, 2014; Viotti *et al.*, 2006), refuerzan la hipótesis de que el estímulo primario para perpetuar la inflamación e incrementar la respuesta inmune es la persistencia del parásito en los tejidos.

3.2 Fases de la enfermedad

La EC se divide en dos estadios muy bien diferenciados: una fase aguda y una fase crónica. La fase crónica a su vez se divide en indeterminada y sintomática (Prata, 2001). La evolución natural de la enfermedad se puede observar en la figura 10.

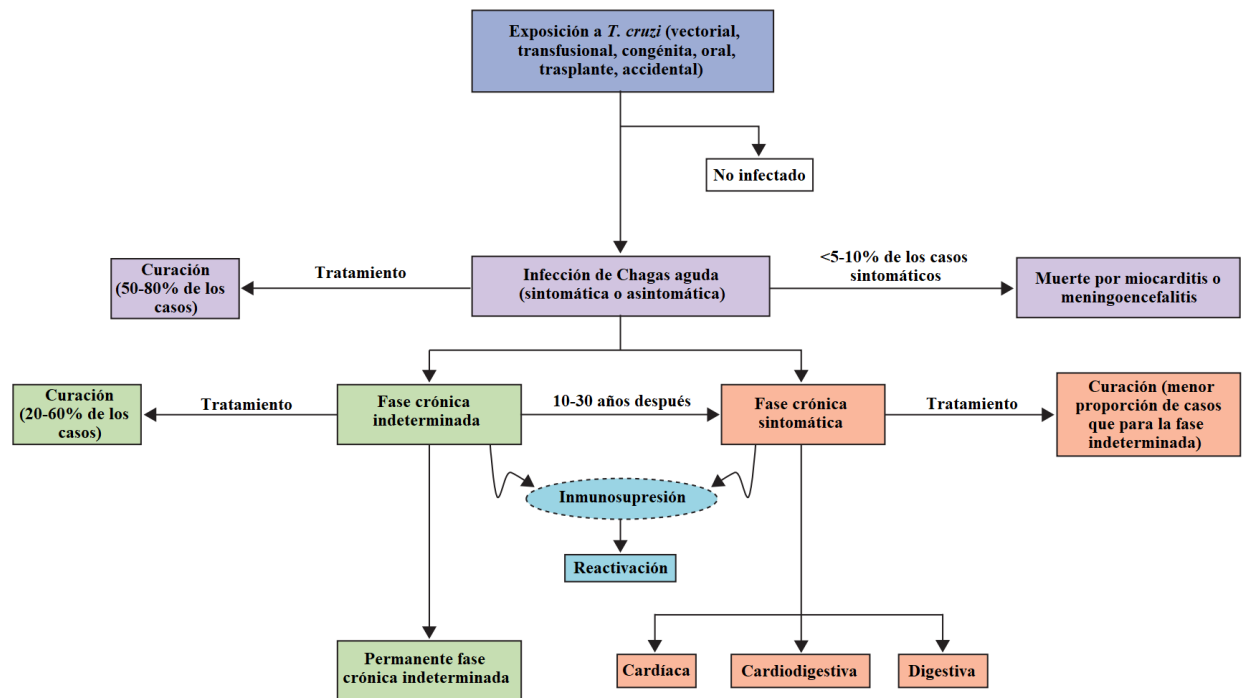


Figura 10. Fases de la infección por *T. cruzi*. Fuente: adaptada de (Rassi *et al.*, 2010).

Fase aguda

La fase aguda se inicia cuando *T. cruzi* entra en el organismo y tiene una duración de entre 2 y 4 meses. En este estadio, el nivel de parasitemia es alto y, por tanto, detectable por técnicas microscópicas, por cultivo y técnicas moleculares. En la mayoría de los casos (90%) cursa con ausencia de sintomatología o con síntomas leves e inespecíficos como fiebre, malestar general, hepatomegalia y linfadenopatías; en el caso de la infección vectorial, se pueden observar los signos clásicos de la entrada del parásito en el organismo: el signo de Romaña o el chagoma (Rassi *et al.*, 2010).

El chagoma es una induración de la piel que se produce en la zona de la entrada del parásito, que suele ir acompañado de adenitis regional generada por la multiplicación del parásito en el interior de los macrófagos locales. Se presenta durante los 15 primeros días posinfección en aproximadamente el 5% de los infectados y suele ser indoloro, localizándose en las zonas de piel que quedan expuestas a la picadura del vector. El signo de Romaña es un edema bpalpebral unilateral e indoloro que se observa cuando el parásito entra en el organismo a través de la conjuntiva. Tras la entrada, *T. cruzi* se disemina sistémicamente pudiendo producir a las 2-3 semanas un cuadro de fiebre inespecífica,

hepatoesplenomegalia, linfadenopatías o anemia (Pérez-Molina y Molina, 2018).

En esta fase aguda se pueden registrar alteraciones en el electrocardiograma como taquicardia sinusal, primer grado de bloqueo atrio-ventricular, voltaje disminuido de la onda QRS, así como alteraciones primarias de la onda T. La tasa de mortalidad de la fase aguda de Chagas se sitúa por debajo del 1% y se produce por fallo cardíaco, meningitis o encefalitis (Prata, 2001).

Fase crónica

Todas las manifestaciones propias de la fase aguda desaparecen de manera espontánea en la mayoría de los enfermos tras 4-8 semanas de la infección, dando paso a la fase crónica indeterminada (60-70% de los infectados).

Esta fase se caracteriza por serología positiva para *T. cruzi*, ausencia de signos clínicos y ausencia de síntomas cardíacos o digestivos. Tanto la radiografía de tórax como el electrocardiograma son normales (Dias, 1989). Los pacientes en fase indeterminada tienen un excelente pronóstico, siendo su esperanza de vida similar a la de individuos sanos (Nunes *et al.*, 2013).

En los últimos años ha incrementado el número de pacientes en fase crónica indeterminada con leves anormalidades a nivel cardíaco o digestivo, debido principalmente al aumento de sensibilidad de las técnicas diagnósticas (ecocardiografía, manometría esofágica, MRI). No obstante, todavía no se conoce si esas alteraciones se relacionan con un peor pronóstico (Pérez-Ayala *et al.*, 2011; Viotti *et al.*, 2004).

Aproximadamente el 30-40% de los pacientes crónicamente infectados por *T. cruzi* pueden desarrollar afectación orgánica a los 10-30 años post-infección. La afectación es principalmente cardíaca o visceromegalia (megaesófago, megacolon, o ambos) (Bittencourt *et al.*, 1975; Coura *et al.*, 1985; Espinosa *et al.*, 1985). Estos datos corresponden a estudios realizados en zona endémica en los años 1980, donde el contexto socioeconómico, la pérdida de seguimiento, la repetida exposición al vector, la falta de conocimiento de las

DTUs implicadas y la severidad del episodio inicial pudieron sesgar la información.

Aunque los trabajos en la literatura son escasos desde entonces, recientes estudios en área endémica han mostrado que la progresión de la enfermedad crónica indeterminada a cardíaca se sitúa entre el 1,4-5% por año (Machado-de-Assis *et al.*, 2013; Sabino *et al.*, 2013; Viotti *et al.*, 2006).

3.3 Manifestaciones clínicas

Manifestaciones cardíacas.

Las manifestaciones cardíacas son las más frecuentes y severas, apareciendo en el 14-45% de los pacientes crónicos sintomáticos y afectan principalmente al sistema de conducción y al miocardio (Pérez-Ayala *et al.*, 2011; F. Salvador *et al.*, 2014). Entre un 20 y un 30% de pacientes de zona endémica tienen afectación cardíaca subclínica, por lo que es importante realizar pruebas de afectación orgánica aun en ausencia de sintomatología.

La cardiopatía chagásica crónica es denominada miocardiopatía dilatada al manifestarse por una cardiomegalia, la cual suele ser visible en una radiografía simple de tórax. Son comunes las anormalidades electrocardiográficas como la atrio-ventricular o el retraso en la conducción, los cambios en la repolarización ventricular y los latidos ectópicos; siendo la asociación de bloqueo de rama derecha con hemibloqueo anterior izquierdo el trastorno más frecuente (Ribeiro *et al.*, 2013; Traina *et al.*, 2017).

En el 15-20% de los pacientes con miocardiopatía chagásica, la alteración cardíaca es más acentuada, con una mayor afectación de la función ventricular, derivando en bradiarritmias sintomáticas, insuficiencia cardíaca, fenómenos tromboembólicos, taquiarritmias ventriculares sostenidas y/o muerte súbita (Carod-Artal, 2006).

Manifestaciones digestivas.

Las manifestaciones digestivas son menos comunes (10-21%) y aparecen casi exclusivamente al sur de la cuenca Amazónica (principalmente en

Argentina, Bolivia, Brasil y Chile), siendo raras en el norte de Sudamérica, Centroamérica y México. Esta distribución geográfica se debe a los diferentes DTUs predominantes en cada región (Campbell *et al.*, 2004; Coura *et al.*, 1985; Miles *et al.*, 2003).

Las manifestaciones más frecuentes son megaesófago y megacolon. La afectación digestiva fluctúa desde desórdenes en la motilidad a leve acalasia y megaesófago severo. Los síntomas incluyen disfagia, odinofagia, reflujo esofágico, tos y regurgitación. Los pacientes con megaesófago pueden tener mayor riesgo de padecer cáncer de esófago, por lo que deben ser estudiados por endoscopia gastrointestinal.

El megacolon es la complicación más común, afectando al 6,3% de los pacientes con EC y se caracteriza por estreñimiento persistente, pudiendo derivar en fecaloma, vólvulo o isquemia intestinal (Castro *et al.*, 2010). Tanto el colon sigmoideo como el recto están dilatados en todos los casos de megacolon, mientras la dilatación segmentos colónicos más proximales es inusual. Sin embargo, no suele existir afectación del intestino delgado, ni de la vía biliar (de Oliveira *et al.*, 1998).

Manifestaciones del sistema nervioso.

Son las menos frecuentes de todas. Se presentan como polineuritis sensitivo-motora caracterizada por hipoestesia y parestesia, pero principalmente por la reducción o abolición de los reflejos osteo-tendinosos.

A nivel del sistema nervioso central, la principal complicación es la meningoencefalitis, la cual se produce en la fase aguda de la enfermedad o en las reactivaciones en pacientes inmunodeprimidos. En la fase crónica, se han reportado casos aislados de cambios a nivel psicológico, pero todavía no se cuenta con la suficiente evidencia que permita definir una fase clínica clara (Prata, 2001).

Manifestaciones congénitas.

La infección congénita por *T. cruzi* es una infección aguda, asintomática en la mayoría de los casos. Los signos y síntomas son inespecíficos y tan solo

el 10% de los recién nacidos infectados desarrollan manifestaciones clínicas (Torrice *et al.*, 2004). Las complicaciones más habituales se pueden manifestar incluso antes del nacimiento (muerte fetal y aborto espontáneo), al nacer (bajo índice de Apgar, prematuridad o bajo peso al nacer) o en los primeros días de vida (distrés respiratorio, anemia, ictericia, miocarditis o hepatoesplenomegalia) (Carlier y Truyens, 2010). Existen pocos datos sobre mortalidad neonatal, aunque se estima que se sitúa entre el 5% y el 14% de los infectados sin tratamiento (García-Bourmissen *et al.*, 2009).

3.4 Tratamiento

Actualmente, las dos únicas moléculas que han demostrado su eficacia contra la EC son benznidazol [Rochagan® y Radanil®, Roche (ambos actualmente discontinuados) y Abarax®, laboratorios Elea] y nifurtimox (Lampit®, Bayer Health Care) (de Andrade *et al.*, 1996; Sosa Estani *et al.*, 1998; Viotti *et al.*, 2006). Ambas moléculas han demostrado ser eficaces en la fase aguda de la enfermedad, pero su elevada frecuencia de reacciones adversas, los bajos índices de curación y la falta de un consenso internacional sobre los criterios de curación han limitado su uso en la fase crónica (Jannin y Villa, 2007).

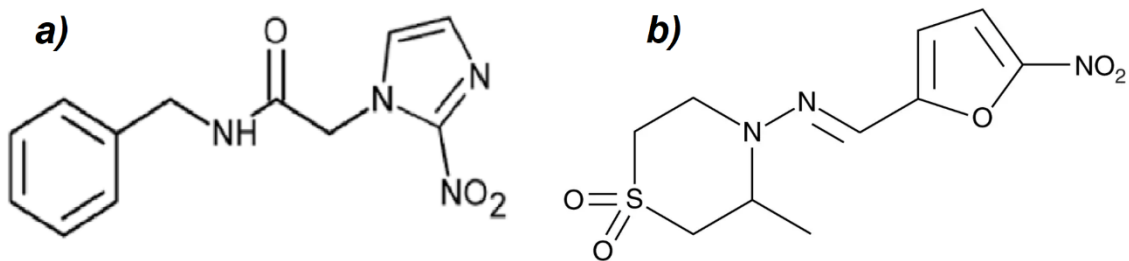


Figura 11. Representación de la fórmula molecular de los compuestos: a) benznidazol y b) nifurtimox.

El benznidazol es un nitroimidazol (N-bencil-2-nitroimidazol acetamida) que actúa inhibiendo la síntesis de ARN del parásito y genera acumulación de superóxidos. Fue aprobado por la FDA (Agencia de alimentos y medicamentos, EEUU) el 29 de agosto de 2017. Su posología es de 5-7mg/kg/día en 2 ó 3 tomas durante 60 días en adultos y 10 mg/kg/día en 2 tomas durante 60 días en niños.

Su eliminación es 70% hepática y 30% renal, no necesitando ajuste de dosis en pacientes con insuficiencia renal o hepática.

Los efectos adversos más comunes son de tipo dermatológico, principalmente dermatitis por hipersensibilidad que suele revertir con la administración de antihistamínicos, aunque se han registrado casos de dermatitis exfoliativa, severa o dermatitis asociada a linfadenopatías y fiebre, que han obligado a interrumpir el tratamiento. También pueden producir neuropatía periférica dosis dependiente hasta en un 30% de pacientes, la cual revierte al interrumpir el tratamiento. Por último, la mielosupresión es un efecto adverso raro que obliga a suspender el tratamiento.

El nifurtimox es un nitrofurano [5-nitrofurano 3-metil-4-(5'-nitrofurlideneamina) tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido] que actúa por toxicidad en el ADN del parásito debido a la acumulación de superóxidos y radicales libres. Su posología es de 8-10 mg/kg/día durante 90 días en adultos y 15 mg/kg/día durante 90 días en niños, ambas en 4 tomas diarias. Su metabolismo es hepático y necesita ajuste tanto en insuficiencia hepática como renal. Sus principales efectos adversos son digestivos (vómitos, diarrea, náuseas, anorexia) y neuropsiquiátricos (alteración del sueño, irritabilidad y neuropatías periféricas).

La principal limitación de ambos fármacos es el elevado número de reacciones adversas que producen. Se han descrito hasta en el 40% de los pacientes tratados con benznidazol (Carrilero *et al.*, 2011) y en el 61% de los pacientes tratados con nifurtimox (Murcia *et al.*, 2012), lo que conlleva en la mayoría de los casos la suspensión del tratamiento.

Sin embargo, en la población pediátrica ambos fármacos son bien tolerados y la aparición de reacciones adversas es inusual (Altcheh *et al.*, 2014). En los estudios realizados en población pediátrica en fase aguda y en la infección congénita se ha demostrado que reducen la gravedad de los síntomas, la parasitemia y el curso de la enfermedad. Además, su uso en la infección congénita durante el primer año de vida obtiene una tasa de curación cercana al 100% (Altcheh *et al.*, 2011; Carlier *et al.*, 2011).

Si bien ambos medicamentos son activos en la fase aguda de la enfermedad, el benznidazol es el utilizado en la mayoría de esquemas como tratamiento de primera línea, ya que existen más estudios que avalan su eficacia y presenta menos efectos adversos (Bern *et al.*, 2007).

A pesar de que estas dos moléculas son activas en la fase aguda, su uso en la fase crónica siempre ha sido cuestionado. Las tasas de curación en fase crónica se sitúan entre el 8% y el 40%, entendiendo curación como seronegativización y ausencia de parasitemia. Este hecho, unido al elevado número de reacciones adversas, limitaba su uso en adultos en fase crónica. Sin embargo, se ha demostrado que aunque no elimine al parásito por completo, el tratamiento de la EC en fase crónica reduce la progresión hacia la cardiopatía y disminuye la mortalidad (Villar *et al.*, 2014; Viotti *et al.*, 2006).

Por tanto, el tratamiento está recomendado en los casos de infección congénita, en infección aguda, en reactivaciones y niños menores de 18 años. En los pacientes con EC crónica entre 19 y 55 años, se debería ofrecer el tratamiento ya que existen más ventajas que inconvenientes. En los adultos por encima de los 55 años el riesgo de toxicidad es mayor que en los pacientes jóvenes, por lo que el tratamiento debería ser opcional. Por último, el tratamiento está contraindicado en formas avanzadas de la EC y en las mujeres embarazadas (Bern *et al.*, 2007; Roca Saumell *et al.*, 2015; Sosa-Estani *et al.*, 2012).

Desde la introducción de benznidazol y nifurtimox, sólo el alopurinol y los triazoles (inhibidores de la síntesis del ergosterol) han sido evaluados en ensayos clínicos y estudios observacionales. La monoterapia con ravuconazol o posaconazol no ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la EC crónica (Molina *et al.*, 2014), y la combinación de posaconazol y benznidazol no proporcionó ninguna ventaja de eficacia o seguridad con respecto al tratamiento de benznidazol en monoterapia (Morillo *et al.*, 2017).

En cuanto a la posología, algunos estudios recientes sugieren que los actuales regímenes de tratamiento podrían optimizarse con la administración de esquemas de dosis intermitentes (5mg/kg/día en 2 tomas al día cada 5 días

durante 60 días) (Álvarez *et al.*, 2016) o dosis reducidas (2,5 mg/kg/día durante 60 días en adultos y 5-8 mg/kg/día durante 60 días en niños) (Altcheh *et al.*, 2014; Soy *et al.*, 2015), que han conseguido eliminar la parasitemia sin recidivas detectables mediante PCR.

4 Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la EC, como el de la mayoría de las enfermedades infecciosas, se basa en datos epidemiológicos, clínicos y pruebas de laboratorio.

A nivel epidemiológico, es de consideración no sólo conocer si el paciente ha viajado o procede de zona endémica, sino también la existencia de padres, hermanos u otros familiares que padezcan la enfermedad. La clínica es importante en los casos en los que el signo de Romaña o el Chagoma sea visible (fase aguda) así como en los pacientes con bloqueo completo de rama derecha, megaesófago o megacolon (fase crónica sintomática), que en países como Brasil tienen un valor predictivo positivo superior al 95%, 90% y 98%, respectivamente. También son datos de interés el recuerdo de una picadura o el haber visitado zonas rurales donde el vector esté presente.

En cuanto al diagnóstico de laboratorio, el abordaje va a depender de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente (Tabla 4, figura 12).

Tabla 4. Técnicas de diagnóstico empleadas en la infección por *T. cruzi* en función de la fase de la enfermedad.

Infeción aguda	Infeción crónica
Diagnóstico parasitológico	
Observación en fresco (400x)	PCR
Tinción de Giemsa	Micrométodo INP
Microhematocrito/ Strout	Hemocultivo
Micrométodo INP	
Xenodiagnóstico	
Hemocultivo	
PCR	
Diagnóstico serológico	
ELISA	ELISA
IFI	IFI
HAI	HAI
	Western-blot
	Inmunocromatografía

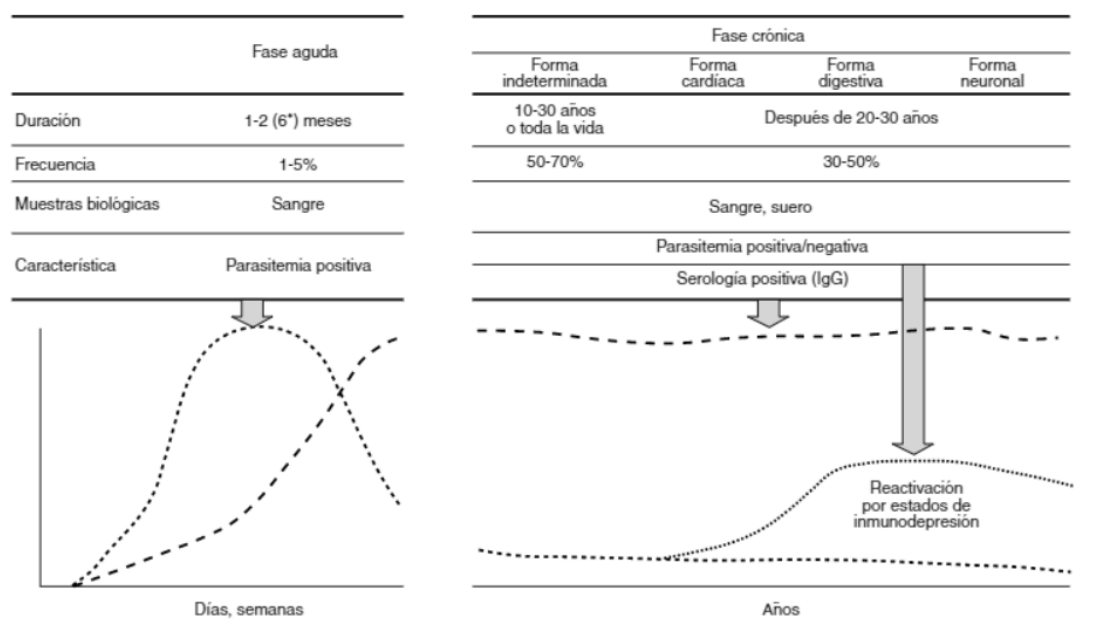


Figura 12. Evolución de la parasitemia (línea de puntos) y la cinética de anticuerpos (línea discontinua) en la EC (Flores-Chávez *et al.*, 2007).

4.1 Diagnóstico parasitológico

En la fase aguda de la enfermedad, la **observación en fresco** al microscopio (400x) de sangre periférica nos permite detectar la presencia del parásito debido los rápidos movimientos que realiza entre las células sanguíneas.

La realización de la **tinción de Giemsa** en gota gruesa o extensión de sangre nos permiten, además de obtener el diagnóstico, observar las características morfológicas del parásito. Tanto la visión en fresco como las tinciones poseen una sensibilidad del 85%, así que cuando el nivel de parasitemia es bajo, se requiere utilizar técnicas de concentración para aumentar la sensibilidad.

Para ello, se desarrollaron 3 técnicas con la finalidad de observar los tripomastigotes de *T. cruzi* en sangre periférica: el **método de Strout**, el **microhematocrito** y el **micrométodo INP**. Todas ellas emplean como método de concentración la centrifugación, gracias a la que aumentamos la sensibilidad

con respecto a la tinción, llegando hasta el 95% (Bua *et al.*, 2013; de Rissio *et al.*, 2009; Feilij *et al.*, 1983; Luquetti y Rassi, 2000; Strout, 1962).

La observación en fresco, así como la observación tras concentración, precisan que el parásito esté vivo para poder visualizar su movimiento entre las células sanguíneas, por lo que son técnicas que necesitan que el retraso entre la toma de la muestra y la visualización sea mínimo.

Además de las técnicas de tinción directa y las de concentración, existen otros métodos que nos permiten aislar el parásito y multiplicarlo *in vitro*: el xenodiagnóstico y el hemocultivo.

El **xenodiagnóstico** nos permite aislar *T. cruzi* de la sangre de un paciente infectado (Brumpt, 1914). Ha sido muy utilizado en el pasado, aunque en la actualidad el cultivo de *T. cruzi* se puede realizar de forma artificial, con la misma sensibilidad que se obtiene con el xenodiagnóstico y evitando la exposición del paciente a las picaduras del triatomino, por lo que se encuentra en desuso.

El **hemocultivo** consiste en obtener sangre periférica anticoagulada del paciente y centrifugarla (con el fin de retirar los anticuerpos que podrían interferir en el crecimiento de *T. cruzi*). Una vez centrifugada, se cultiva en medio Novy-McNeal-Nicolle (NNN) o en el medio de cultivo Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado con suero bovino fetal en un 20% (López Eyzarguirre, 1999; Schmatz y Murray, 1981).

Tanto el xenodiagnóstico como el hemocultivo son técnicas que sólo se encuentran disponibles en laboratorios especializados y cuyo resultado no nos ofrece un diagnóstico temprano (el resultado negativo se obtiene a los 3 meses); sin embargo, son de gran interés científico, ya que nos permiten aislar las cepas de *T. cruzi* para su posterior estudio genético.

4.2 Diagnóstico molecular

La implementación de la biología molecular en el diagnóstico de la EC comenzó en la década de los noventa, con la aparición de varios protocolos de PCR “*in house*” desarrollados para su uso en investigación (Moser *et al.*, 1989; Wincker *et al.*, 1994).

Posteriormente, la aparición de diversas PCR comerciales a tiempo real ha permitido la inclusión de la biología molecular en el algoritmo diagnóstico de la infección congénita (Abrás *et al.*, 2017; Simón *et al.*, 2019) y su uso en el seguimiento del aclaramiento parasitológico postratamiento (Murcia *et al.*, 2010). Aunque existen numerosas dianas moleculares para la detección de *T. cruzi* (Tabla 5), las dianas más empleadas son el ADN satélite (ADNsat) de *T. cruzi* (una familia de secuencias altamente repetitivas denominada E13, distribuida en la mayoría de los cromosomas del parásito) y la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto (ADNk), que amplifican fragmentos de 195pb y 330pb, respectivamente (Moser *et al.*, 1989); (Wincker *et al.*, 1994).

Tabla 5. Dianas y cebadores utilizados para la detección de *T. cruzi* mediante PCR. Adaptado de (Schijman *et al.*, 2011).

Diana	Cebadores	Tamaño del amplificado
Minicírculo ADNk	121-122	330pb
	S35-S36	330pb
	32f-148r	118pb
Miniexón	TC1-TC2	350pb
ADNsat	Tcz1-Tcz2	195pb
	TczF-TczR	182pb
	cruzi 1-2	111, 195pb
24s α - ARNr	D71-D72	110, 125pb
18 SSU- ARNr	Tc18s F3-F4	165pb
SL-ADN	Tcc-Tc1-Tc2	300, 350pb
CO II-ADN	Tcmit31-40	290pb
	Nested Tcmit 10-21	375pb

Tanto el ADNsat como el ADNk de *T. cruzi* se encuentran representados en un número de copias similar (120.000). Esto indica que, a priori, la sensibilidad obtenida por ambas técnicas debería ser equivalente.

Sin embargo, el ADNk parece ser una mejor diana molecular, ya que la cantidad de copias de la secuencia es constante entre las diferentes DTUs. En el caso de los parásitos TcI, el número de secuencias satélites se ha estimado en un 10% comparado con otras DTUs; por lo tanto, la sensibilidad que presentan las PCR que amplifican ADNsat varía entre DTUs mientras que la sensibilidad que presentan las PCR que amplifican ADNk es uniforme (Duffy *et al.*, 2009).

La PCR es útil en la fase aguda de la enfermedad, donde el nivel de parasitemia es mayor. Es especialmente interesante en el diagnóstico de infección congénita, así como en las reactivaciones producidas en pacientes trasplantados o inmunodeprimidos, ya que éstas cursan con parasitemias elevadas. Asimismo, en este tipo de pacientes, bien por la inmunosupresión o por la transmisión de anticuerpos maternos en caso de las infecciones congénitas, el diagnóstico serológico posee una utilidad limitada.

En fase crónica, la PCR pierde sensibilidad en comparación con el diagnóstico serológico. Se estima que la sensibilidad de la prueba en pacientes crónicos se sitúa entre el 50-90% (Brasil *et al.*, 2010). Sin embargo, puede resultar útil en el control del tratamiento de pacientes con EC con ADN de *T. cruzi* detectable en sangre, donde una PCR negativa postratamiento confirma la eliminación del parásito en sangre (Murcia *et al.*, 2010).

Amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP)

La técnica LAMP es una técnica de amplificación de ADN a temperatura constante. A diferencia de la PCR, no existen diferentes ciclos de temperatura y la técnica no requiere un termociclador para realizarse. Además, los productos amplificados pueden visualizarse a simple vista gracias al SYBR green, que vira de naranja a verde cuando la reacción es positiva.

Los estudios realizados demuestran que su sensibilidad y especificidad puede llegar a ser comparable a la de la PCR (Avendaño y Patarroyo, 2020;

Besuschio *et al.*, 2017) y debido a que no necesita de un termociclador para realizarse y su resultado puede leerse a simple vista, puede ser una herramienta válida para el diagnóstico en aquellas zonas donde no se pueda disponer de grandes equipamientos.

Aunque se han llevado a cabo grandes esfuerzos para validar internacionalmente las técnicas de biología molecular (Bua *et al.*, 2013; Schijman *et al.*, 2011), actualmente sigue sin disponerse de un protocolo de PCR estandarizado para el diagnóstico, así como tampoco se ha incorporado la técnica LAMP en la rutina diaria de los laboratorios.

4.3 Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico de la EC se basa en la detección de anticuerpos IgG totales frente a *T. cruzi*. Tradicionalmente, las técnicas se dividen en 2 tipos: convencionales y no convencionales. El diagnóstico serológico es convencional cuando el antígeno empleado es el parásito completo (Inmunofluorescencia indirecta [IFI]) o una mezcla compleja de antígenos de parásito (hemaglutinación indirecta [HAI] y enzimoimmunoensayos [ELISA]). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos utilizados son recombinantes, purificados o péptidos sintéticos (OMS, 2002)

Dado que ningún ensayo alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, y que existen reacciones cruzadas entre *T. cruzi* y otras patologías (malaria, sífilis, leishmaniasis visceral y mucocutánea, toxoplasmosis...), el diagnóstico serológico de certeza está basado en el uso de 2 técnicas de distinto principio antigénico (OMS, 2002). Si los resultados son discordantes, se recomienda realizar una tercera prueba de confirmación, así como el diagnóstico diferencial con otras enfermedades parasitarias.

Diagnóstico serológico convencional

La detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* ha sido y es el principal método utilizado para el diagnóstico de la EC.

En la actualidad, las técnicas más utilizadas son la **hemaglutinación indirecta** (HAI), la **inmunofluorescencia indirecta** (IFI), el radioinmunoensayo (RIPA) y los **enzimoimmunoensayos** (ELISA).

Antiguamente existían otras pruebas como el test de fijación del complemento (Guerreiro y Machado, 1913) o la aglutinación directa con 2-Mercaptoetanol (Peralta *et al.*, 1981), que empleaban fracciones antigénicas totales o semi-purificadas de las formas epimastigote de *T. cruzi*, con una pobre sensibilidad y especificidad, por lo que actualmente se encuentran en desuso.

La **HAI** se basa en la sensibilización de hemáties con antígenos citoplasmáticos de *T. cruzi* adsorbidos en su superficie mientras que, en la **IFI**, los antígenos adheridos al portaobjetos son las formas epimastigote del parásito. Ambas técnicas son cuantitativas, y nos permiten obtener el título de anticuerpos, pero para ello es necesario realizar diluciones seriadas resultando laborioso y además, la lectura es subjetiva, ya que depende del operador.

Por otro lado, ambas técnicas pueden presentar reacciones cruzadas con otros parásitos como *Trypanosoma rangeli* o *Leishmania spp.*, aunque las reacciones cruzadas con *T. rangeli* en el caso de la IFI pueden evitarse utilizando formas tripomastigote en lugar de epimastigotes como antígeno (de Moraes *et al.*, 2008).

En la técnica de **ELISA**, los antígenos de *T. cruzi* adheridos a las microplacas son extractos de antígeno crudo o epimastigotes para la detección de anticuerpos IgG e IgM. Se trata de una técnica semiautomatizada y de fácil realización, evitando así la necesidad de operadores bien entrenados. Al ser una prueba colorimétrica, el resultado se define como lectura de absorbancia o densidad óptica y no depende del observador.

Los ELISA convencionales utilizan extracto crudo del parásito, por lo que se han reportado reacciones cruzadas con *T. rangeli* y otros tripanosomátidos como *Leishmania sp.* (de Moraes *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2001a).

El RIPA se basa en la sensibilización de antígenos de epimastigotes de *T. cruzi* con ¹²⁵I, un isótopo radioactivo del yodo. Posteriormente el complejo antígeno-anticuerpo formado se separa mediante electroforesis hasta obtener 2 glicoproteínas de 72 y 90 kDa, las cuales se detectan mediante un contador gamma. La detección de estas dos glicoproteínas permite aumentar la especificidad de la prueba con respecto a los ELISA convencionales, sin

embargo, el uso de isótopos radioactivos ha relegado esta técnica a su uso en investigación (Kirchhoff *et al.*, 1987; Leiby *et al.*, 2000).

Diagnóstico serológico no convencional

Las pruebas serológicas no convencionales son las que utilizan antígenos recombinantes, purificados o quiméricos para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, aumentando su especificidad con respecto a las técnicas convencionales (Mucci *et al.*, 2017).

Dentro de este conjunto se encuentran las pruebas inmunocromatográficas, los ELISA, el Western blot y las nuevas técnicas enzimáticas basadas en la quimioluminiscencia de micropartículas (CMIA) y la electroquimioluminiscencia (ECLIA).

Las pruebas de **inmunocromatografía** utilizan antígenos purificados adheridos a una tira de nitrocelulosa que reaccionan con los anticuerpos del paciente y un conjugado de oro coloidal. Se trata de pruebas de diagnóstico rápido (15-30 min) que requieren de un pequeño volumen de suero o sangre total y no necesitan de personal entrenado, ni equipamiento externo (Barfield *et al.*, 2011; Sánchez-Camargo *et al.*, 2014).

Además de los ELISA basados en antígenos crudos ya mencionados, existen una gran variedad de ELISA que utilizan mezclas de antígenos recombinantes y/o purificados de *T. cruzi*, aumentando así su especificidad y sensibilidad con respecto a las técnicas convencionales (Peralta *et al.*, 1994; Umezawa *et al.*, 1999).

La utilización de antígenos recombinantes aumenta la especificidad de los ELISA recombinantes llegando al 100% cuando se utilizan sueros de pacientes con leishmaniasis, en comparación con los ELISA de antígenos crudos, cuya especificidad se sitúa entre el 85-90% (Caballero *et al.*, 2007a). Algunos de los ELISA comerciales disponibles en España se detallan en la tabla 6.

En los últimos años se han incorporado nuevas técnicas como **CMIA** y **ECLIA**; ambas son técnicas automatizadas que emplean antígenos recombinantes unidos a micropartículas y cuyos conjugados emiten luz que es captada por un luminómetro; de esta manera se aumenta su sensibilidad con

respecto a las reacciones cromógenas de los ELISA. Además poseen una elevada robustez y un alto rendimiento (Flores-Chavez *et al.*, 2018; Iborra-Bendicho *et al.*, 2012).

Por último, la técnica de **Western blot** es utilizada fundamentalmente como técnica de confirmación de los resultados positivos o ambiguos obtenidos por las técnicas empleadas habitualmente. Es una técnica analítica, ampliamente utilizada, para el estudio de proteínas. Este método permite la detección de proteínas dentro de una muestra biológica. Su mayor especificidad se logra mediante el uso de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo único de las proteínas de interés; su principal inconveniente es su elevada laboriosidad y precio (Berrizbeitia *et al.*, 2006).

Existen varios protocolos de Western blot en la literatura con excelentes valores de sensibilidad y especificidad (95% y 100%, respectivamente) (Escalante *et al.*, 2014; Sánchez *et al.*, 2001a), y recientemente, se ha comercializado en Europa un inmunoblot (Chagas Western Blot IgG assay, LDBIO, Francia) que ha alcanzado una sensibilidad y especificidad del 100% en una colección de 278 sueros (Brossas *et al.*, 2021).

Tabla 6. Test ELISA comercializados en España. Los datos de sensibilidad y especificidad son los ofrecidos por el fabricante. Fuente: Ministerio de Sanidad y Política Social de España. Disponible en: <https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/publicaciones/docs/informeChagasJulio09.pdf>

Casa comercial	Nombre de la prueba	Tipo de antígeno	Sensibilidad	Especificidad
Inverness Medical	Inmunofluor Chagas (Biocientífica)	Epimastigotes	SE	SE
LabClinics	Biognost®IFA	Epimastigotes	SE	SE
Innogenetics Ibérica	IFA Kit Tripanosomiasis (MarDx)	Epimastigotes Corpus Christi	SE	SE
Vitros	<i>T. cruzi</i> IgG ELISA (Cellabs)	Antígeno total	SE	SE
Jonson&Johnson	ORTHO® <i>T. cruzi</i> ELISA Test System	Antígeno total	100	100
Abbot Diagnostic	CERTEST Chagas ELISA Test	Antígeno total	100	100
BLK Diagnostics	BLK <i>T. cruzi</i> IgG ELISA	Extracto total alcalino (cepa Y)	SE	SE
BioMérieux España	Elisa <i>cruzi</i> (Enfermedad de Chagas)	Antígeno total	100	100
Izasa	Bioelisa Chagas Biokit	Antígeno recombinante	100	97,4-99,5
Diasorin / Radim Ibérica / Siemens Healthcare Diagnostics	NovaLisa™ Chagas (<i>T. cruzi</i>) IgG ELISA	Antígeno recombinante	86,7	91
Inverness Medical / Laboratorios Leti / CTK Biotech	OnSite Chagas Ab Combo Rapid Test	Antígeno recombinante	92,9	100
Operon SA	<i>Stick Chagas</i>	Antígeno recombinante	99	95
RAL Técnica para el Laboratorio, S.A.	Chagas Check-1 Gernon	Antígeno recombinante	98,1	98,4

SE= Sin especificar

A pesar de los avances en el campo de la serología, actualmente no se dispone de técnicas serológicas con un 100% de sensibilidad y especificidad, por lo que la OMS sigue recomendando el empleo de dos técnicas con un principio antigénico diferente para establecer el diagnóstico de EC.

4.4 Procedimientos diagnósticos de la Enfermedad de Chagas

Las técnicas de laboratorio empleadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas van a depender en función del contexto del paciente y de la fase de la infección en la que se encuentre. Teniendo esto en cuenta, debemos adoptar diferentes procedimientos:

- **Diagnóstico de infección aguda:** En la fase aguda de la enfermedad debemos realizar técnicas parasitológicas o moleculares para detectar al parásito en sangre.
- **Diagnóstico de infección crónica:** Se deben utilizar 2 test serológicos con diferente principio antigénico, el primero de ellos debe poseer una alta sensibilidad y el segundo una buena especificidad. Si hay discordancia, se realizará un tercer test. Las técnicas moleculares quedan relegadas al seguimiento del tratamiento y estudio de reactivaciones.
- **Estudios epidemiológicos:** En este caso debemos utilizar un test serológico con alta sensibilidad, utilizando como muestra suero, plasma o sangre total.
- **Diagnóstico congénito:** Dado que la madre transmite anticuerpos IgG al recién nacido durante el embarazo, el diagnóstico se debe basar en técnicas parasitológicas y moleculares en los primeros meses y complementarse con un estudio serológico a los 6-9 meses de vida para confirmar el aclaramiento de los anticuerpos maternos.
- **Cribados en bancos de sangre:** Para evitar cualquier falso negativo, se debe utilizar un test serológico con alta sensibilidad como un ELISA convencional, CMIA o ECLIA.

5 Coinfección *Trypanosoma cruzi* con otros parásitos

5.1 *Strongyloides* sp.

La estrongiloidiasis es una enfermedad causada por geohelminetos de la familia *Strongyloididae*. El género *Strongyloides* se clasifica en el orden *Rhabditoidea*, en el que la mayoría de las especies son habitantes del suelo de vida libre. Existen 52 especies, de las cuales 2 son capaces de parasitar al ser humano, *Strongyloides stercoralis* y *Strongyloides fuelleborni*, aunque el patógeno más frecuente es *S. stercoralis* (Grove, 1996).

Ambos poseen un ciclo de vida parasitario y otro ciclo de vida libre. La infección ocurre cuando el hospedador entra en contacto con suelos que contienen la larva filariforme del parásito (estadio infectivo). Una vez ha penetrado a través de la piel, la larva se desplaza hacia los pulmones, produciendo una lesión eritematosa y pruriginosa que avanza de 1 a 5cm al día (larva migrans cutánea). *S. stercoralis* madura en el pulmón y posteriormente viaja hasta la tráquea, donde es tragado e invade la mucosa del intestino delgado, donde se fija con su escólex y comienza a poner huevos. Los huevos salen al exterior con las heces completando así su ciclo. Algunas larvas rhabditiformes son capaces de madurar en el intestino a larvas filariformes, las cuales penetran a través de la piel perianal, perpetuando así un ciclo de autoinfección (Mora Carpio y Meseeha, 2021).

S. stercoralis predomina en los países de climas tropicales y subtropicales, en áreas rurales y suburbanas, principalmente de bajo nivel socioeconómico, donde las condiciones del suelo y la humedad ambiental favorecen el desarrollo de la fase de vida libre del parásito (figura 13); también se ha reportado su presencia en zonas más templadas como el sur de Europa, Japón, Australia o el sur de Norteamérica (Al-Hasan *et al.*, 2007; Salvador *et al.*, 2014). Infecta principalmente al hombre, y se estima que 100 millones de personas están infestadas con este parásito en todo el mundo (Figuera *et al.*, 2002; Schär *et al.*, 2013).

Una vez que la parasitosis se establece en el hospedador, la infección se mantiene por el ciclo de autoinfección pudiendo durar décadas. En la infección

crónica, entre el 32% y el 43% no presenta síntomas (Igual Adell y Domínguez Márquez, 2007).

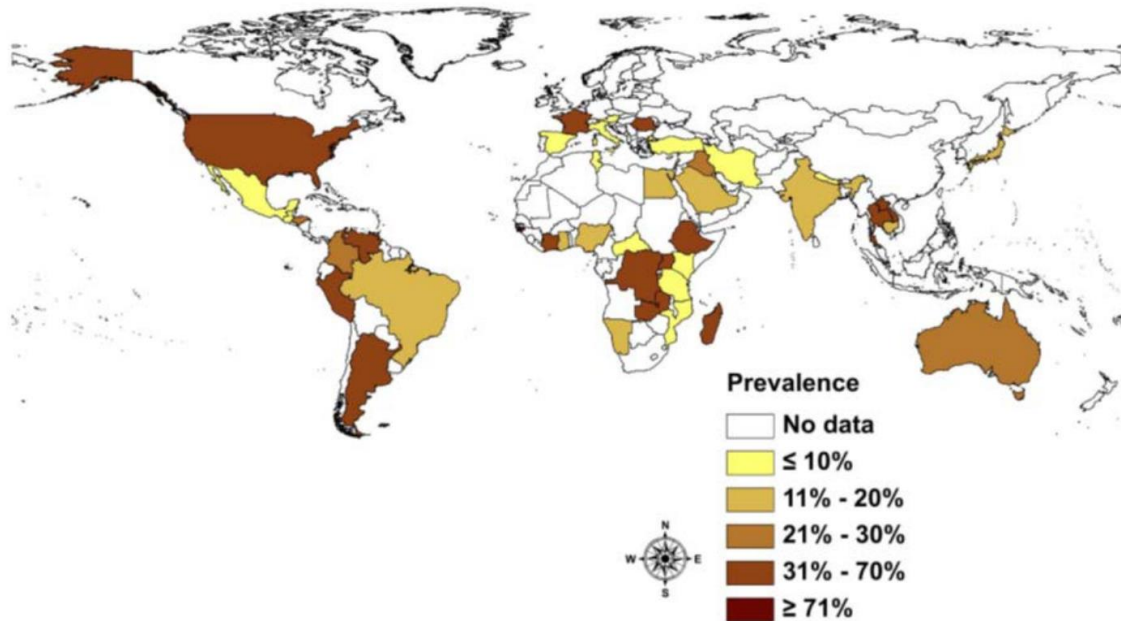


Figura 13. Prevalencia de *Strongyloides stercoralis* en el mundo (Schär *et al.*, 2013).

La infección crónica se caracteriza por altos niveles de eosinófilos (porcentaje de eosinófilos $\geq 5\%$) y anticuerpos IgG anti-*S. stercoralis* positivos en sangre. La mayoría de pacientes infectados crónicamente son asintomáticos, aunque algunos tienen una variedad de síntomas gastrointestinales (dolor abdominal, reflujo, diarrea, náuseas) y cutáneos (rash, hipersensibilidad) (Schär *et al.*, 2013).

El síndrome de hiperinfestación es la manifestación más severa, con alta tasa de mortalidad. Se produce en pacientes inmunodeprimidos, con la inmunidad celular deficiente, permitiendo que las larvas se diseminen desde el tracto digestivo y puedan parasitar varios órganos a la vez (Grove, 1996).

El diagnóstico de estrongiloidiasis se puede realizar mediante examen de heces o mediante métodos serológicos. La visión directa mediante microscopía de larvas rhabditiformes en las heces tiene una baja sensibilidad (21%) debido a la liberación irregular de las larvas y a su baja cantidad. Complementariamente, se utilizan métodos de concentración para aumentar la sensibilidad como la técnica de Baermann (72%) o la técnica de cultivo-migración en placa (89%) (Campo Polanco *et al.*, 2014). En cuanto a la serología, los ELISA con antígenos

purificados han demostrado poseer una excelente sensibilidad (93%) y especificidad (100%) (Levenhagen y Costa-Cruz, 2014).

El tratamiento va dirigido a eliminar al parásito del organismo para evitar la posibilidad de autoinfección, tratar las infecciones sintomáticas y prevenir las complicaciones asociadas con las infecciones asintomáticas. El tratamiento de elección es ivermectina 200 µg/kg durante 2 días, ya que elimina tanto a los parásitos adultos como a las larvas. La pauta de albendazol 800mg/día durante 3-7 días también se ha utilizado, mostrándose menos efectiva para el tratamiento de infección no complicada por *S. stercoralis* (Henriquez-Camacho *et al.*, 2016).

5.2 *Toxocara sp.*

La toxocariasis es una antropozoonosis cosmopolita con gran riesgo para la salud en poblaciones vulnerables, particularmente en el embarazo y la infancia.

Estudios de seroprevalencia llevados a cabo en Estados Unidos han detectado presencia de anticuerpos en un 13,9% de la población (Won *et al.*, 2008). La seroprevalencia estimada y distribución de infección por *Toxocara canis* se muestra en la figura 14.

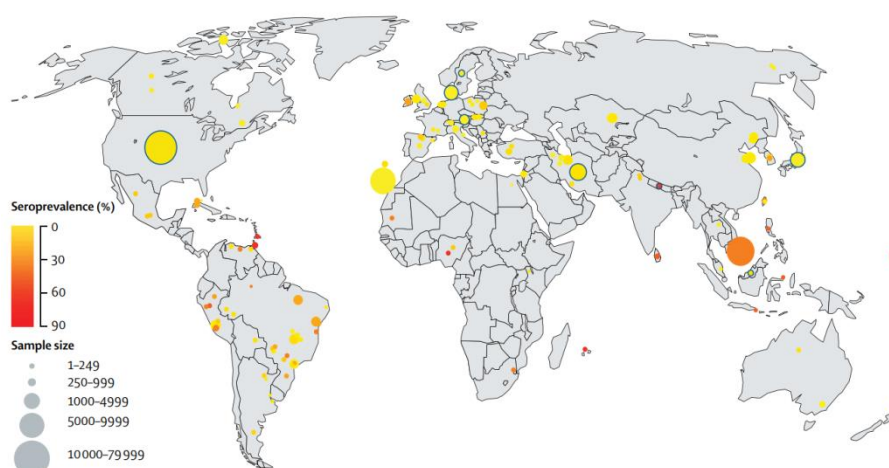


Figura 14. Prevalencia de *T. canis* en el mundo (Ma *et al.*, 2018).

Su principal mecanismo de transmisión es la ingesta accidental de comida, agua o tierra que contenga huevos de *Toxocara sp.*, particularmente *T. canis* de los perros o *T. cati* de los gatos (Ma *et al.*, 2018; Magnaval *et al.*, 2001).

En los seres humanos, la larva de *Toxocara* penetra la mucosa intestinal y migra a través del hígado, pulmones y otros órganos por medios mecánicos y digestión proteica (Finsterer y Auer, 2007; Pivetti-Pezzi, 2009). Las larvas son atacadas por el sistema inmune del hospedador, provocando una respuesta inflamatoria local asociada a eosinofilia e incrementando la producción de citoquinas y anticuerpos específicos. Aunque la mayoría de las infecciones son subclínicas, pueden manifestarse como síndromes conocidos como larva migrans visceral, larva migrans ocular, neurotoxocariasis y toxocariasis común (Pivetti-Pezzi, 2009; Taylor *et al.*, 1988).

El diagnóstico de toxocariasis en hospedadores paraténicos como los humanos se puede realizar mediante exámenes histopatológicos, evaluación morfológica de las larvas o la detección de ADN de tejidos o muestras de fluidos corporales (Smith y Noordin, 2006). También se pueden utilizar métodos serológicos para su diagnóstico, aunque por sí solos no nos proporcionan un diagnóstico inequívoco de infección (Poulsen *et al.*, 2015).

La sensibilidad y especificidad de los ensayos serológicos para el diagnóstico de toxocariasis depende tanto de los antígenos utilizados (extractos crudos de larvas de *T. canis*, antígenos recombinantes de excreción/secreción) y el tipo de anticuerpo detectado (IgG totales, subclases de IgG o IgM) (Elefant *et al.*, 2016; Roldán *et al.*, 2015).

El tratamiento de la toxocariasis es complicado, ya que se requiere que los fármacos alcancen a las larvas a través de una gran variedad de tejidos y resulta difícil evaluar la eficacia de los fármacos. Sin embargo, el tratamiento es obligado en las toxocariasis agudas, particularmente para prevenir que las larvas lleguen al cerebro o a los ojos (Pawlowski, 2001; Wiśniewska-Ligier *et al.*, 2012).

Los fármacos más utilizados son albendazol y mebendazol, siendo el primero el más recomendable ya que se distribuye ampliamente a través de los tejidos al metabolizarse. Además, el uso de antiinflamatorios (corticoesteroides, antiinflamatorios no esteroideos) está indicado ya que puede aliviar los síntomas

causados por las respuestas alérgicas. En algunos casos concretos o muy graves, estaría indicada la cirugía para la extracción de las larvas, como en la larva migrans ocular (Martínez-Pulgarín *et al.*, 2015).

5.3 *Schistosoma sp.*

De entre las diferentes especies de trematodos que infectan a los humanos, *Schistosoma sp.* son los parásitos con el mayor impacto en salud pública, afectando a más de 240 millones de personas y con 700-800 millones de personas en riesgo de infección (Gryseels *et al.*, 2006).

Los gusanos macho y hembra parasitan diferentes localizaciones del hospedador humano, donde tiene lugar la reproducción sexual y la producción de huevos fertilizados. Estos huevos son expulsados al exterior por las heces o la orina y al alcanzar agua dulce eclosionan, liberando miracidios ciliados de vida libre que infectarán al hospedador intermediario (diferentes especies de caracoles). En el hospedador intermediario, el parásito se reproduce asexualmente hasta la formación de esporoquistes, dando lugar a miles de cercarias que se liberan al agua (forma infectiva para los humanos). Una vez que la cercaria penetra en la piel del mamífero hospedador, se requieren entre 5 y 7 semanas para que los esquistosomas sean adultos y empiecen a producir huevos (Colley *et al.*, 2014).

La evidencia científica sugiere que la morbilidad producida por la infección de *Schistosoma sp.* es debida a sus huevos y no a los parásitos adultos (Burke *et al.*, 2009). La mayoría de huevos no son excretados y se alojan permanentemente en los intestinos o hígado (*S. mansoni*, *S. japonicum* y *S. mekongi*) o en la vejiga y el sistema urogenital (*S. haematobium*). En esos lugares, los huevos inducen una respuesta inmune granulomatosa caracterizada por la presencia de linfocitos, eosinófilos y macrófagos activados. La formación de estos granulomas induce una inflamación crónica que deriva en las manifestaciones de la infección por *Schistosoma sp.* (Fairfax *et al.*, 2012; Pearce y MacDonald, 2002).

El “gold standard” del diagnóstico microbiológico se basa en la observación de huevos viables en orina (*S. haematobium*), heces (*S. mansoni*, *S. japonicum*) o biopsias de tejido. Las técnicas moleculares para la detección

de *Schistosoma sp.* tiene una mayor sensibilidad que la microscopía (Ten Hove *et al.*, 2008), aunque todavía están limitadas por la excreción irregular de los huevos.

Los ensayos serológicos ha demostrado utilidad clínica para el diagnóstico, especialmente en viajeros sintomáticos, pero en personas que viven en zonas endémicas, la serología es incapaz de discriminar entre infección activa y exposición pasada (Tsang y Wilkins, 1997).

El fármaco de elección para el tratamiento es el praziquantel. Es efectivo contra todas las especies de *Schistosoma*. Su dosis es de 40 mg/kg para la infección por *S. haematobium* y *S. mansoni* y de 60 mg/kg para el tratamiento de las infecciones producidas por *S. japonicum* y *S. mekongi*. Para que el tratamiento sea eficaz, requiere de una respuesta de anticuerpos efectiva del hospedador (Brindley y Sher, 1987; Doenhoff *et al.*, 2008).

II. OBJETIVOS.

A causa de la globalización y de los movimientos poblacionales, la EC se ha convertido en un problema de salud global. Los pacientes con EC que viven en zonas no endémicas, no son debidamente diagnosticados, bien por desconocimiento de los profesionales sanitarios, bien por la falta de protocolos de actuación.

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) en el año 2021 vivían en España 1.137.165 personas de origen latino, de los que 40.901 residían en la Región de Murcia, lo que supone el 2,89% de la población de la Región.

Pese a la falta del vector fuera de zona endémica, existen otras vías de transmisión no vectoriales que generan la aparición de nuevos casos de EC en zonas en las que nunca antes se había diagnosticado. Es fundamental que conozcamos las herramientas de las que disponemos para el diagnóstico y seguimiento de la EC.

A pesar de la gran cantidad de pruebas de las que se dispone en la actualidad, no existe ningún ensayo que obtenga el 100% de sensibilidad y especificidad. Además, dependiendo de la fase en la que se encuentre la enfermedad, el abordaje diagnóstico es diferente, ya que la parasitemia detectable en el estadio inicial de la enfermedad da paso a una baja e intermitente parasitemia en la fase crónica, lo cual sumado a la insidiosa instauración de los síntomas provoca que esté infradiagnosticada.

El objetivo principal de este trabajo es evaluar, en el contexto de un país no endémico, la utilidad de los ensayos disponibles para el diagnóstico y seguimiento de la EC. Este objetivo principal se concreta con los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluar la calidad de los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas en el diagnóstico de la EC.
- Establecer una equivalencia entre los títulos de anticuerpos obtenidos por pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el valor índice (S/CO) obtenido por quimioluminiscencia de micropartículas (CMIA).

- Evaluar diferentes técnicas comerciales de biología molecular para la detección de ADN de *T. cruzi*.
- Valorar la utilidad de la quimioluminiscencia de micropartículas en el diagnóstico de ECC.
- Estudiar la prevalencia de coinfección con otros parásitos endémicos, y determinar la utilidad de diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico y seguimiento postratamiento de la infección por *S. stercoralis*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 Pacientes y muestras clínicas

Las muestras empleadas en este trabajo han sido remitidas y procesadas en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA).

EL HCUVA es un hospital de tercer nivel que posee 919 camas y pertenece al Área de Salud I (Murcia/Oeste), cuya población es de 266.460 habitantes. Además, es el hospital de referencia de la Región de Murcia, donde se encuentra ubicada la Unidad Regional de Medicina Tropical (URMT).

Todas las muestras se analizaron siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002) para el diagnóstico de la EC, realizando 2 técnicas serológicas de distinto principio antigénico. Como test de referencia utilizamos un ensayo quimioluminiscente (ARCHITECT Chagas®; Abbot, Alemania), que emplea proteínas recombinantes del parásito como antígenos, e IFI (CHAGAS IFI IgG+IgM®; Vircell, España) que utiliza formas epimastigote de *T. cruzi*.

Los pacientes se consideraron infectados cuando existía concordancia entre los resultados obtenidos con el ensayo quimioluminiscente y la IFI, además de compatibilidad con los datos clínicos y epidemiológicos.

Tabla 7. Resumen de los grupos de pacientes/número de muestras seleccionados en función del estudio realizado.

Grupos de estudio	Nº de pacientes/muestras	Origen de los pacientes
Grupo .1: Control de calidad interno en el diagnóstico serológico (CMIA).	4	Pool de sueros (Pool 1) elaborado con 3 pacientes con EC crónica y 1 suero de un paciente español que nunca había viajado a zona endémica.
Control de calidad externo: sensibilidad analítica de diferentes técnicas serológicas.	8	Controles de calidad suministrados por el PNCQ (6) y la OMS (2)
Grupo 2: Relación entre los títulos de IFI y los valores de CMIA para el seguimiento de la EC.	3	Pool de sueros (Pool 2) elaborado con 3 pacientes de origen Latinoamericano con infección crónica por <i>T. cruzi</i> y valor de S/CO > 10 obtenido mediante CMIA.
Grupo 3.: Evaluación del límite de detección (LOD) de diferentes técnicas de biología molecular	1	ADN purificado de <i>T. cruzi</i> AMPLIRUN® TRYPANOSOMA DNA CONTROL (Vircell, España).
Evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de EC.	91	Pacientes con EC crónica y recién nacidos de madre con EC.
Evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de ECC.	71	58 embarazadas con infección crónica por <i>T. cruzi</i> y 13 recién nacidos de madre con EC.
Grupo 4. Utilidad de la Quimioluminiscencia de micropartículas en el diagnóstico de ECC.	72	Embarazadas de origen Latinoamericano con infección crónica por <i>T. cruzi</i> .
	75	Hijos de madre con EC.
Grupo 5.: Estudio de seroprevalencia frente a <i>S. stercoralis</i>, <i>Schistosoma sp.</i> y <i>T. canis</i> en pacientes con y sin EC.	661	119 pacientes con EC y 542 pacientes sin EC.
Estudio de coinfección por <i>S. stercoralis</i> en pacientes con EC crónica.	254	Pacientes de origen Latinoamericano con infección crónica por <i>T. cruzi</i> .
Evaluación de 2 técnicas ELISA comerciales para el diagnóstico y seguimiento de estrongiloidiasis.	55	Pacientes de origen Latinoamericano con EC y coinfección por <i>S. stercoralis</i> .

1.1 Muestras empleadas para el Control de Calidad en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas

Control de Calidad Interno

En este estudio se utilizó una agrupación de sueros de pacientes con EC crónica (Pool 1) con un índice de S/CO con valores comprendidos entre 2,5 y 4. El Pool 1 fue alicuotado en 10 tubos eppendorf de 1,5mL y congelado a -20°C. Posteriormente, las alícuotas se descongelaron y procesaron en 10 días consecutivos en el analizador ARCHITECT i2000S® (Abbott, Alemania).

Una vez realizadas todas las determinaciones, se elaboró un diagrama de Levey-Jennings en el que la línea central representa la media de las 10 mediciones y las siguientes líneas horizontales (hacia arriba la suma y hacia abajo la resta) de la media más/menos una desviación estándar (DE), la media más/menos 2 desviaciones estándar y la media más/menos 3 desviaciones estándar.

Posteriormente, el gráfico de Levey-Jennings se analizó siguiendo las reglas de Westgard (Westgard *et al.*, 1981):

1. Regla 1-2s: Indica si un control evaluado excede el límite de 2 DE. Alerta.
2. Regla 1-3s: Indica si un control evaluado excede el límite de 3 DE. Detecta un error aleatorio inaceptable y el inicio de un posible error sistemático. Obligatorio.
3. Regla 2-2s: Cuando dos puntos consecutivos exceden del mismo lado 2 DE. Si se produce esto, se detecta un error sistemático. Alerta.
4. Regla R-4s: Cuando dos valores consecutivos de diferentes controles se encuentran uno por debajo de menos 2 veces la DE y otro por arriba de 2 veces la DE. Si ocurre, se está en presencia de un error aleatorio. Obligatorio.
5. Regla 4-1s: Cuando 4 resultados de control superan 1 DE del mismo lado. Posible error sistemático y se resuelve calibrando o mantenimiento del sistema. Alerta.

6. Regla 10-x: Diez puntos consecutivos se encuentran del mismo lado por encima o debajo de la media. Para un control indica una diferencia que debe ser considerada como alerta.

Las reglas 1, 3, 5 y 6 son de alerta, por lo que, si se incumple alguna de ellas, debemos realizar una revisión de los procedimientos del ensayo, comprobar los reactivos y calibrar los equipos. Las reglas 2 y 4 son obligatorias, por lo que, si alguna de ellas se cumple, se deben rechazar los resultados obtenidos.

Control de Calidad Externo

La evaluación de la sensibilidad analítica de las diferentes pruebas serológicas empleadas en el diagnóstico de EC, se realizó con 3 sueros liofilizados del Programa Nacional de Control de Calidad de Brasil (PNCQ) en los años 2019 y 2021.

Para ello, se reconstituyeron las muestras liofilizadas con 2ml de agua destilada, se mezclaron y dejaron en reposo durante al menos 30 minutos antes de su uso. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{2}$ (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64). Las equivalencias entre las diluciones de los estándares y su concentración en mIU/ml se detallan en la tabla 8.

Tabla 8. Equivalencia entre las diluciones y la concentración de anticuerpos de *T. cruzi* de los estándares de la OMS. Adaptado de: Flores-Chavez *et al.*, (2018).

Dilución	Concentración (mIU/ml)
1	500,0
1:2	250,0
1:4	125,0
1:8	62,5
1:16	31,3
1:32	15,6
1:64	7,8

En todas las muestras (muestra original y diluciones) se determinaron los valores de S/CO, títulos de anticuerpos y resultado cualitativo, mediante CMIA,

IFI e ICT, respectivamente. Las determinaciones se realizaron por duplicado en dos días consecutivos, según los protocolos de cada una de las técnicas.

Por último, se utilizaron también los estándares biológicos de referencia del primer programa de estándares de Referencia Internacionales de la OMS (Sáez-Alquezar *et al.*, 2020).

Se trata de 2 preparaciones congeladas y liofilizadas, codificadas como NIBSC 09/186 y NIBSC 09/188. NIBSC 09/186 corresponde a anticuerpos anti-*T. cruzi* (TcII) recogidos de individuos de Brasil y Chile. NIBSC 09/188 corresponde a anticuerpos anti-*T. cruzi* (TcI) recogidos de individuos de México. Cada uno de los estándares fueron preparados utilizando 0,5mL de agua destilada para obtener una solución de stock 1:1. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas desde 1:2 hasta 1:64. En todas las muestras (muestra original y diluciones) se determinaron los valores de S/CO, títulos de anticuerpos y resultado cualitativo, mediante CMIA, IFI e ICT respectivamente.

1.2 Muestras empleadas en el estudio de equivalencia entre el título de anticuerpos (IFI) y el valor índice (CMIA) de pacientes con ECC.

Para la comparativa entre la técnica de IFI y la de CMIA se empleó una agrupación de muestras formada por 3 sueros de pacientes con EC crónica sin tratar con valores obtenidos por CMIA de S/CO>10 (Pool 2).

Una vez preparado el Pool 2, se realizaron diluciones seriadas a 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320. El Pool 2 y todas las diluciones se analizaron por triplicado mediante CMIA. Posteriormente, se realizó IFI del Pool 2 y de todas sus diluciones.

1.3 Muestras empleadas en la evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas.

Determinación del Límite de Detección (LOD)

Para evaluar el LOD de las técnicas de biología molecular empleadas en el estudio, se utilizó ADN de *T. cruzi* purificado [AMPLIRUN® TRYPANOSOMA DNA CONTROL (Vircell, España)], con una concentración de **19.000 copias/μL** de genoma completo del parásito.

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 del control hasta obtener una concentración de $1,9 \times 10^{-7}$ copias/μL.

El estándar y sus diluciones se analizaron en paralelo mediante 3 técnicas moleculares con diferentes dianas (ADN kinetoplasto o ADN satélite) (Tabla 9)

- PCR convencional "in house" (ADNk).
- PCR a tiempo real de la casa comercial Progenie® (ADNsat).
- PCR a tiempo real de la casa comercial Altona® (ADNk).

Tabla 9. Replicados realizados con cada técnica en cada una de las concentraciones utilizadas.

Concentración (copias/μl)	Replicados PCR-Alt	Replicados PCR-Pro	Replicados "in house"
19	10	0	0
1,9	10	10	10
$1,9 \times 10^{-1}$	10	10	10
$1,9 \times 10^{-2}$	10	10	10
$1,9 \times 10^{-3}$	10	10	10
$1,9 \times 10^{-4}$	10	10	10
$1,9 \times 10^{-5}$	10	0	10
$1,9 \times 10^{-6}$	10	0	10
$11,9 \times 10^{-7}$	10	0	10

Comparativa de técnicas de biología molecular

Para la comparativa de las diferentes técnicas de biología molecular se utilizaron un total de 91 muestras de sangre total.

De éstas, 78 eran de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* procedentes de Bolivia y 13 correspondían a hijos de madre con EC crónica nacidos en la Región de Murcia (Figura 15).

En el subapartado de comparativa para el diagnóstico de ECC se utilizaron 71 de las muestras de la cohorte principal, que corresponden a 58 gestantes con EC crónica no tratada y a 11 recién nacidos de madre con EC que no desarrollaron la enfermedad. Las 2 muestras restantes corresponden a un niño de 7 y otro de 9 años que desarrollaron ECC.

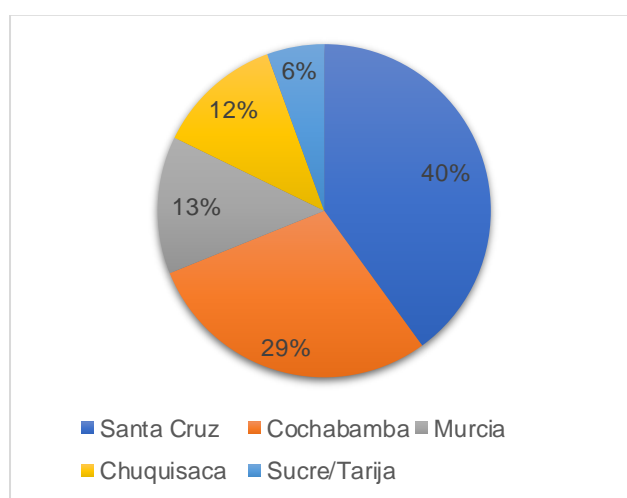


Figura 15. Origen geográfico de los pacientes que participaron en el estudio de comparativa de técnicas moleculares.

1.4 Muestras empleadas en el estudio del aclaramiento de anticuerpos anti-*T. cruzi* en recién nacidos de madre con Enfermedad de Chagas.

Para el estudio de aclaramiento de anticuerpos maternos en los recién nacidos, se utilizaron muestras de 75 niños, nacidos de 72 madres latinoamericanas con EC crónica que dieron a luz en el HCUVA. La mayoría de las mujeres eran de nacionalidad boliviana (97%) y, al dar a luz en España, descartamos la posibilidad de otras vías de trasmisión diferentes a la congénita.

Se obtuvieron muestras de sangre de cordón (8ml) al nacer y sangre periférica (2ml) al mes de vida. De estas muestras, aproximadamente 0,5ml de sangre se utilizó para realizar el microhematocrito. La sangre restante se mezcló

inmediatamente con el mismo volumen de buffer de lisis (Guanidina-CLH 6M/EDTA 200mM pH 8) y se conservó a 4°C durante al menos 48h.

Además, se obtuvieron muestras de suero (10ml) de las madres durante el embarazo y muestras de los niños (2ml) a los 0-2 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses para realizar la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* mediante IFI y CMIA.

Los niños se consideraron sanos cuando los 2 test serológicos fueron negativos en cualquier momento, e infectados si ambos permanecían positivos a los 12 meses de edad o alguna de las técnicas parasitológicas era positiva al nacimiento y/o al mes de vida. En caso de detectarse alguna infección congénita, el niño se trató con benznidazol 10mg/kg al día durante 60 días.

1.5 Muestras empleadas en el estudio de coinfección con diferentes parásitos en pacientes con Enfermedad de Chagas crónica.

Coinfección con otros parásitos

Se realizó un estudio retrospectivo de seroprevalencia frente a *Schistosoma sp.*, *Toxocara canis* y *S. stercoralis* en 119 pacientes con EC, así como un estudio de seroprevalencia frente a los mismos parásitos en 542 pacientes sin EC, pero con sospecha de parasitosis.

Globalmente, se realizaron un total de 204 determinaciones frente a *T. canis*, 332 frente a *Schistosoma sp.* y 535 frente a *S. stercoralis*. En la tabla 10 se detalla el número de determinaciones correspondientes a pacientes con EC y a pacientes sin EC con sospecha de parasitosis.

Tabla 10. Número de determinaciones serológicas realizadas frente a *Schistosoma sp.*, *Toxocara canis* y *S. stercoralis* en pacientes con y sin EC.*

	Pacientes con EC	Pacientes sin EC	TOTAL
<i>T. canis</i>	66	138	204
<i>S. stercoralis</i>	111	424	535
<i>Schistosoma sp.</i>	86	246	332

*El número de determinaciones es menor que el de pacientes en cada grupo debido a que a todos los pacientes de cada grupo no se les realizaron las 3 determinaciones.

Coinfección con *Strongyloides stercoralis*

Se utilizaron un total de 254 muestras de suero de pacientes procedentes de Latinoamérica con EC crónica para estudiar la coinfección con *S. stercoralis*. De los 254 pacientes, 249 procedían de Bolivia, 2 de Argentina, 2 de Brasil y 1 de Ecuador (figura 16).

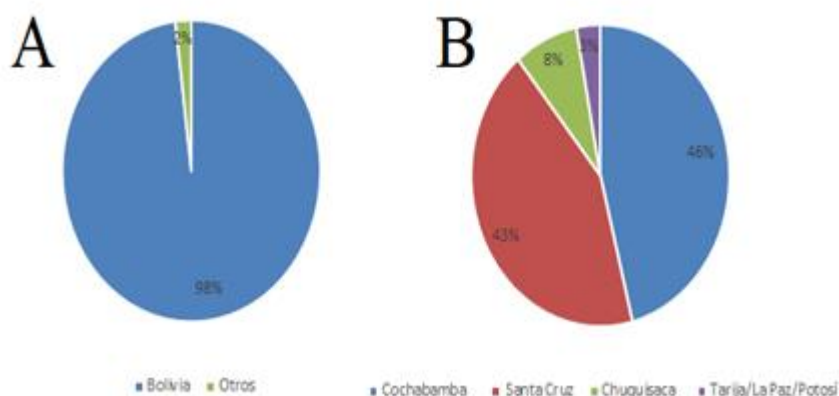


Figura 16. Origen geográfico de los pacientes que participaron en el estudio en función de su país de procedencia (A) y el departamento de la República de Bolivia (B).

1.6 Muestras empleadas en la evaluación de 2 técnicas ELISA comerciales para el diagnóstico y seguimiento de estrogiloidiasis.

Para la comparativa de las técnicas ELISA empleadas en el diagnóstico de *S. stercoralis* se utilizó una muestra de 55 pacientes de la cohorte del estudio anterior.

Por último, para el estudio del seguimiento postratamiento, se seleccionó una muestra de 30 pacientes del estudio anterior.

2 Diagnóstico microbiológico de la Enfermedad de Chagas

2.1 Técnicas parasitológicas

Microhematocrito

El microhematocrito, es una técnica de concentración que aumenta el redimiendo de la microscopía convencional. Para su realización se requiere de 0,5 a 1ml de sangre.

Los elementos de la sangre se separan por gradiente de densidad, concentrándose los glóbulos rojos en la parte inferior del capilar mientras que el plasma queda en la parte superior (zona líquida y transparente). En la interfase podemos encontrar un anillo blanquecino de 1mm de altura que está formado por los glóbulos blancos, zona donde se visualizará el parásito en caso de estar presente.

Brevemente, la muestra de sangre se recoge en tubos capilares heparinizados y se centrifuga durante 2 minutos a 5.000 rpm. Posteriormente, el capilar se coloca sobre un portaobjetos (sujetado mediante una cinta adhesiva) y se observa el movimiento de los parásitos en la interfase entre los hematíes y el plasma (capa leucocitaria) con el microscopio óptico a 400x (Feilij *et al.*, 1983).

2.2 Técnicas serológicas

Dado que la mayoría de pacientes de nuestro estudio se encuentran en la fase crónica de la enfermedad, el diagnóstico de infección por *T. cruzi* se ha basado en las técnicas serológicas. Siguiendo las recomendaciones de la OMS, hemos empleado dos técnicas serológicas con distinto principio antigénico: CMIA (ARCHITECT Chagas®, Abbott, Alemania) e IFI (CHAGAS IFI IgG+IgM®, Vircell, España). Ambas técnicas se han realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Se utilizó el ensayo comercial de CHAGAS IFI IgG+IgM (Vircell, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación, se describe brevemente el procedimiento.

Los componentes del kit deben atemperarse durante 30 minutos antes de iniciar la determinación. Las muestras de suero a estudio se diluyeron en tampón fosfato (PBS) (1/80 y 1/160) y posteriormente se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una cámara húmeda. A continuación, se realizó un lavado rápido con PBS y 2 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno sumergiendo los portaobjetos en un vaso de Coplin con PBS. Los portaobjetos se secaron sacudiendo el exceso de PBS sobre papel absorbente y se añadió sobre las zonas reactivas anti-IgG, IgM humana marcada con isocianato de

fluoresceína (FITC), incubándose durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron con PBS y las áreas reactivas se cubrieron con azul de Evans 0,1% incubándose 4 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda. Tras lavar el exceso de colorante con PBS, se añadió el medio de montaje (tampón glicerina pH 9,5) y el cubreobjetos evitando la formación de burbujas. Por último, las preparaciones se observaron inmediatamente en el microscopio de fluorescencia (Olympus U-RFLT50).

Siguiendo las instrucciones del fabricante, una reacción positiva será aquella en la que observemos fluorescencia tanto periférica como citoplasmática y flagelar, considerando títulos $\geq 1/80$ como positivos. El título de suero vendrá dado por la máxima dilución a la que se observe una reacción positiva.

Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)

ARCHITECT Chagas® (Abbott, Alemania) es un ensayo cualitativo totalmente automatizado para la detección de anticuerpos IgG frente a *T. cruzi*.

Brevemente, en un primer paso se combinan la muestra y el diluyente de la misma. A continuación, se añaden 4 antígenos recombinantes de *T. cruzi* (FP3, FP6, FP10 y TcF) (Chang *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007) que se encuentran unidos a micropartículas paramagnéticas. Después de realizar un lavado, las muestras se incubaron con anticuerpos murinos anti-IgG humana marcados con acridinio. Tras un último ciclo de lavado, se añaden las soluciones “pre-trigger” y “trigger”.

El resultado de la reacción quimioluminiscente se mide como unidades relativas de luz (RLUs), existiendo una relación directa entre la cantidad de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* que hay en la muestra y las RLUs detectadas. Los resultados se representan como el cociente (S/CO) entre la señal de la muestra (dada en RLUs) y el valor del punto de corte (CO), donde valores de $S/CO > 1$ se consideran como positivos, valores de $S/CO \geq 0,8$ a $0,99$ se consideran indeterminados y valores $S/CO < 0,8$ como negativos.

Los ensayos se realizaron utilizando el sistema ARCHITECTi2000SR (Abbott) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Inmunocromatografía (ICT)

El test inmunocromatográfico Chagas Ab Rapid (Standard Diagnostics, Corea del Sur) se ha realizado siguiendo las directrices del fabricante. Se aatemperaron todos los reactivos a la temperatura de la habitación y se añadieron 100µL de suero de los pacientes en el pocillo. Después de 15 minutos, se procedió a la lectura del resultado.

El ensayo se consideró negativo cuando existía una sola banda de color púrpura (banda "C") dentro de la ventana de resultados, y positivo cuando existían 2 bandas de color púrpura (banda "T" y banda "C") sin importar cuál aparezca primero. Si no se observó ninguna banda pasados los 15 minutos o sólo aparecía la banda "T", el ensayo se consideró como inválido.

2.3 Técnicas moleculares para el diagnóstico de *T. cruzi*: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Extracción del ADN a partir de sangre

La extracción del ADN se realizó a partir de 10ml de sangre periférica en adultos y 2ml en niños o sangre de cordón umbilical. Una vez obtenida la muestra de sangre, se mezcló con igual volumen de tampón de lisis formado por Guanidina-HCl 6M (Sigma, USA) y etilendiamino tetraacético (EDTA) 0,2M pH 8 (Avila *et al.*, 1991) en tubos Falcon de 50ml y se conservó a 4°C durante 24-48h hasta el momento de la extracción del ADN.

Previamente a la extracción del ADN, la mezcla se sometió a un baño de agua en ebullición durante 15 minutos para favorecer la ruptura del ADN (Britto *et al.*, 1993). Siguiendo el protocolo de trabajo previamente publicado (Murcia *et al.*, 2010), la extracción del ADN de las muestras se llevó a cabo por duplicado, utilizando 400µL de la muestra previamente procesada y tratada con calor.

El ADN se extrajo usando el kit MagCore Genomic DNA Whole blood en el sistema automatizado MagCore HF16 (RBC Bioscience, Taiwan).

El ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV/visible de monohaz (Eppendorf BioPhotometer plus) en ng/µl y se determinó la calidad

del ADN extraído comprobando los valores de absorbancia 260/280, considerando aceptables valores superiores a la unidad.

Amplificación de ADN mediante PCR convencional “in house”

Se utilizó como diana molecular el ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*. Los cebadores utilizados fueron los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') y 122 (5'-GTTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), que amplifican la región de 330 pares de bases (pb) del ADN del minicírculo del kinetoplasto, según el protocolo descrito por Murcia y colaboradores (Murcia *et al.*, 2010).

La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 75µL que contiene: 15µL del 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,2mM de mezcla de dNTPs (Applied Biosystems), 200ng de cada oligonucleótido 121 y 122 (Sigma-Aldrich), 2,5 unidades del enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), 2,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) (Promega) y 10µL de ADN extraído de cada muestra a estudio (aproximadamente 200ng).

El termociclador utilizado fue el 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización durante 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de desnaturalización (94°C durante 1 minuto), alineamiento (64°C durante 1 minuto) y polimerización (72°C durante 1 minuto). Tras el último ciclo, se dejaron las muestras en condiciones de polimerización durante 10 minutos.

Para garantizar la correcta amplificación del ADN de las muestras, se incluyeron controles internos en cada una de ellas. Para ello se utilizaron los oligonucleótidos REV (5'- GACGGTATCTGATCGTCTTC-3') y HUF (5'-GGACCGCCTGGATACCGC-3'), cuya diana es el ADN ribosómico humano, siguiendo el mismo protocolo de amplificación descrito anteriormente. Además, se incluyó también un control positivo (muestra de colección de un paciente PCR positivo), así como los controles negativos del proceso de extracción de ADN y de amplificación en ambas reacciones de PCR.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa, Conda) a una concentración del 2%, tampón TBE 0,5x

(Tris-clorhídrico [Tris-HCl] 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,4) y SYBR Safe DNA gel stain (Thermofisher Scientific, USA) en cubetas de desarrollo horizontal. La solución se calentó en microondas durante 3 minutos hasta su total disolución y se dejó solidificar en la cubeta de electroforesis durante 30 minutos. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel con ayuda del tampón de carga (6x) (Sigma, USA). Para determinar el tamaño del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases ("DNA ladder 100pb", Invitrogen). La electroforesis se realizó en las siguientes condiciones: 130 voltios, 35 minutos.

Por último, los geles se visualizaron y fotografiaron en transiluminador de ultravioleta conectado a un equipo de captura de imágenes (U: Genius, Syngene).

Para evitar cualquier problema de contaminación, todos los pasos de la amplificación se realizaron en una habitación y los de detección en otra habitación separada, empleando material y reactivos destinados exclusivamente para cada fase.

Amplificación de ADN mediante RT-PCR de la casa comercial Altona®

El reactivo utilizado fue RealStar® Chagas PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics GmbH, Alemania). Este reactivo utiliza como diana molecular el ADNk, y se compone de:

Master A y Master B, las cuales contienen todos los componentes (tampón de PCR, ADN polimerasa, sal de magnesio, cebadores y sondas) para permitir la amplificación, la detección del ADN específico de *T. cruzi* y el control interno en una configuración de reacción.

Las sondas específicas para el ADN de *T. cruzi* están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el control interno está marcada con el fluorocromo JOE™.

La MasterMix se compone de: 5µL de Master A, 15µL de Master B y 1µL de Control interno. La reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen final de 30µL que contiene: 20µL de MasterMix y 10µL del extraído o control.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador en tiempo real CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización durante 2 minutos a 95°C, 45 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15 segundos), alineamiento (58°C durante 45 segundos) y polimerización (72°C durante 15 segundos).

Por último, se incluyeron los controles para garantizar la ausencia de falsos positivos/negativos, así como el control interno en cada una de las reacciones para corroborar la ausencia de inhibiciones.

La carrera se considerará válida cuando en los controles positivo y negativo se obtengan los siguientes resultados:

	Canal de detección	
	FAM™	JOE™
Control positivo	+	+/-*
Control negativo	-	+

*La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ en el control positivo no es relevante para la validez de la prueba.

Las muestras se consideraron positivas si amplificaba el canal **FAM™**, sin importar el resultado obtenido en el canal **JOE™** y negativas si no amplificaba el canal **FAM™** y sí amplificaba el canal **JOE™** (control interno).

Amplificación mediante RT-PCR de la casa comercial Progenie®

La RT-PCR de Progenie es una PCR cualitativa que utiliza como diana el ADNsat del *T. cruzi*.

El kit RealCycler CHAG-U/CHAG-G (Progenie Molecular, España) se compone del reactivo AmpliMix CHAG (que contiene los cebadores, los dNTPs y todos los elementos necesarios para la reacción de amplificación) y un control positivo. El control interno en esta PCR se encuentra incluido en la MasterMix.

La reacción de amplificación se lleva a cabo en un volumen total de 25µL que contiene 17,5µL del reactivo AmpliMix CHAG y 7,5µL de extraído, de control positivo o de agua destilada estéril en el caso del control negativo.

Una vez añadidos tanto la MasterMix como las muestras/controles, los tubos de reacción se centrifugan durante 5-10 segundos en una minicentrífuga específica, comprobando que no hayan quedado burbujas en el interior.

La amplificación se lleva a cabo en el instrumento SmartCycler® II (Cepheid, USA). Brevemente, se realiza un ciclo de desnaturalización durante 15 minutos a 95°C, 45 ciclos de desnaturalización (95°C durante 15 segundos), alineamiento (60°C durante 30 segundos) y polimerización (72°C durante 30 segundos).

Las sondas específicas para el ADN de *T. cruzi* están marcadas con el fluorocromo FAM™. La sonda específica para el control interno está marcada con el fluorocromo Cy3™.

Por último, se incluyeron los controles para garantizar la ausencia de falsos positivos/negativos, así como el control interno en cada una de las reacciones para corroborar la ausencia de inhibiciones.

	Canal de detección	
	FAM™	Cy3™
Control positivo	+	+/-*
Control negativo	-	+

*La presencia o ausencia de una señal en el canal JOE™ en el control positivo no es relevante para la validez de la prueba.

Las muestras se consideraron positivas si amplificaba el canal **FAM™**, sin importar el resultado obtenido en el canal **Cy3™** y negativas si no amplificaba el canal **FAM™** y sí amplificaba el canal **Cy3™** (control interno).

Amplificación de ADN mediante qPCR a tiempo real “in house”

La PCR cuantitativa “in house” se llevó a cabo utilizando sondas TaqMan, marcadas con fluorocromos que utilizan la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de ADN para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la PCR. El fundamento es el siguiente:

La diana utilizada fue el ADNk de *T. cruzi*, para su detección se utilizaron los oligonucleótidos 32F (59-TTT GGG AGG GGC GTT CA-39) y 148R (59-ATA TTA CAC CAA CCC CAA TCG AA-39) que amplifican una región de 118 pb conservada del ADN del minicírculo del kinetoplasto, siguiendo el protocolo descrito por Qvarnstrom y colaboradores (Qvarnstrom *et al.*, 2012).

La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 20µL que contiene: 2x Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 0,4mM de cada uno de los cebadores 32F y 148R, 0,1mM de la sonda TaqMan con modificación LNA (Locked Nucleic Acids) en los nucleótidos que están subrayados (5´-[HEX] CA TCTC AC CCG TACA TT [TAMRA]-3´) y 5µL de cada muestra de ADN extraída.

La sonda LNA TaqMan es una sonda con nucleótidos modificados que le confieren un aumento en la afinidad por secuencias complementarias; al igual que un aumento en la temperatura de fusión, permitiendo la posibilidad de diseñar sondas cortas con una Tm (Temperatura de “melting”) alta. Los fluoróforos que se utilizaron fueron: HEX como fluorocromo notificador y TAMRA como fluorocromo apantallador.

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y un minuto a 58 °C. Como control negativo se incluyó una determinación con la MasterMix de la PCR y agua destilada estéril.

3 Diagnóstico de otras infecciones parasitarias

3.1 Enzimoimmunoensayo (ELISA)

Detección de IgG anti- *S. stercoralis*

El kit anti-*Strongyloides* ELISA IgG (Euroimmun, Alemania) es un enzimoimmunoensayo semicuantitativo para el diagnóstico serológico de estrongiloidiasis.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, las muestras de suero se diluyeron 1:101 en el buffer de muestras. Seguidamente, se transfirieron 100µl de las muestras diluidas, del calibrador y de los controles positivo y negativo a los pocillos de la microplaca de ELISA.

La placa se incubó durante 60 minutos a 37°C y a continuación se realizaron 3 lavados con 300µl del tampón de lavado proporcionado por el fabricante. Posteriormente, se añadieron 100µl del conjugado (IgG antihumanas conjugadas con peroxidasa) a cada pocillo y la mezcla se incubó durante 30 minutos a 37°C. De nuevo se realizaron los lavados como en el paso anterior y se añadieron 100µl de la solución cromógeno/substrato a cada pocillo, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente (protegido de la luz directa).

Por último, se añadieron 100µl de la solución de parada en el mismo orden en el que se añadió el cromógeno/substrato y se midió con un fotómetro (Asys Jupiter, Hitech GMBH, Austria) la intensidad del color de cada pocillo a una longitud de onda de 450/620-nm en los 30 minutos posteriores a la adición de la solución de parado.

El cálculo de los resultados se llevó a cabo dividiendo la absorbancia de la muestra entre la absorbancia del calibrador obteniendo así la ratio de cada una de las muestras. Posteriormente, los resultados se interpretaron como indica el fabricante:

Ratio < 0,8= **Negativo**

Ratio ≥ 0,8 <1,1= **Indeterminado**

Ratio ≥ 1,1= **Positivo**

El kit Strongyloides IgG ELISA (DRG Instruments, Alemania) es un enzimoimmunoensayo cualitativo para la detección de anticuerpos de *Strongyloides spp.* Todo el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

Inicialmente, se diluyeron 5µl de las muestras con 315µl de solución tampón (dilución 1:64). Seguidamente, se transfirieron 100µl de las muestras

diluidas y de los controles positivo y negativo a los pocillos de la microplaca de ELISA. Uno de los pocillos se dejó vacío (blanco).

La placa se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación se realizaron 3 lavados con 450µl del tampón de lavado proporcionado por el fabricante. Posteriormente se añadieron 2 gotas (100µl) del conjugado enzimático en cada pocillo y la mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se realizaron los lavados como en el paso anterior y se añadieron 2 gotas (100µl) de cromógeno en cada pocillo, incubándose durante 5 minutos a temperatura ambiente (protegido de la luz directa).

Por último, se añadieron 2 gotas (100µl) de la solución quelante en cada pocillo y se midió la intensidad del color de cada pocillo con un fotómetro (Asys Jupiter, Hitech GMBH, Austria) a una longitud de onda de 450/620-nm inmediatamente.

El cálculo de los resultados se llevó a cabo según el fabricante; primero debemos ajustar el fotómetro al cero utilizando el blanco y a continuación se leen cada uno de los pocillos y se interpretan de la siguiente manera:

$DO \geq 0,2 \rightarrow$ **Positivo**

$DO < 0,2 \rightarrow$ **Negativo**

Posteriormente, con el fin de poder comparar los resultados obtenidos entre los 2 ELISA de *S. stercoralis*, los resultados se representaron como la ratio entre la absorbancia de la muestra y 0,2 siguiendo la metodología previamente utilizada por Bon y colaboradores (Bon *et al.*, 2010); por lo que los resultados positivos tendrán un Ratio ≥ 1 y los negativos un Ratio < 1 .

Detección de IgG anti-*Schistosoma sp.* y anti-*Toxocara canis*

La detección de anticuerpos anti-*Schistosoma mansoni* se realizó con el kit *Schistosoma mansoni* IgG ELISA (DRG Instruments, Alemania) y la detección de anticuerpos anti-*Toxocara canis* se realizó con el kit *Toxocara canis* IgG NovaLisa® (NovaTec Immunodiagnostica, Alemania). Ambos se realizan con el mismo procedimiento:

Siguiendo las instrucciones de los fabricantes, las muestras de suero se diluyeron 1:101 con el tampón de dilución de muestras. Seguidamente, se transfirieron 100µl de las muestras diluidas, del calibrador y de los controles positivo y negativo a los pocillos de la microplaca de ELISA. El pocillo A1 se dejó vacío para el blanco. Los pocillos se recubrieron con tiras adhesivas y se incubaron a 37°C durante 1 hora.

Una vez terminada la primera incubación, se retiraron todas las muestras y los controles de la placa y se realizaron 5 lavados con 300µl de tampón de lavado. Posteriormente, se añadieron 100µL del conjugado en cada pocillo y se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Pasados los 30 minutos, se retiró el conjugado y se realizaron 5 lavados con 300µl de tampón de lavado. Tras los lavados, se añadieron 100µL de la solución de Sustrato TMB en todos los pocillos y se incubó la placa durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.

Pasados 15 minutos, se añadieron 100µL de la solución de parada, produciéndose un cambio de coloración de azul a amarillo en los pocillos.

Por último, se ajustó el fotómetro (Asys Jupiter, Hitech GMBH, Austria) al cero utilizando el blanco y se midió inmediatamente la intensidad del color de cada pocillo a una longitud de onda de 450/620-nm.

El cálculo de los resultados se llevó a cabo mediante la siguiente fórmula:

$$DU = \frac{\text{Absorbancia de la muestra}}{\text{Cut - off}}$$

Los resultados se interpretaron como indica el fabricante:

DU < 0,9 = **Negativo**

DU 0,9-1,1= Zona intermedia

DU > 1,1 = **Positivo**

4 Tratamiento

Se les ofreció tratamiento a todos los pacientes diagnosticados de EC o de infección por *S. stercoralis* en los que no existiera ninguna contraindicación

por el uso de otros medicamentos que pudieran interactuar con el tratamiento antiparasitario o por afectación hepática o renal.

Los tratamientos suministrados fueron los siguientes:

- Los pacientes pediátricos con infección por *T. cruzi* se trataron con benznidazol (Abarax®) 10mg/kg de peso al día durante 60 días.
- Los pacientes con infección por *S. stercoralis* se trataron con ivermectina 200 µg/kg durante 2 días.

5 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL).

Para comparar las variables cuantitativas del estudio se emplearon el test de Student para comparar 2 grupos entre sí y el análisis de varianza (ANOVA) para cohortes de más de 2 grupos.

Para la comparativa de los diferentes resultados obtenidos en el estudio comparativo de diferentes técnicas moleculares y en el estudio de coinfección de *T. cruzi* con *Strongyloides stercoralis*, los resultados se ordenaron en una tabla de contingencia de 2x2 y se calcularon los siguientes índices diagnósticos: sensibilidad (S), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se utilizó el índice Kappa de Cohen (Cohen, 1960) para estudiar la concordancia entre los resultados.

La interpretación de los valores Kappa son los siguientes: 0-0,20 acuerdo insignificante, 0,21-0,40 acuerdo mediano, 0,41-0,60 acuerdo moderado, 0,61-0,80 acuerdo sustancial y 0,8-1 acuerdo casi perfecto.

Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05.

6 Consideraciones éticas

Este estudio se ha realizado de acuerdo con la declaración de Helsinki y bajo la aprobación del comité ético y la comisión de investigación del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) de Murcia.

Tras explicar detenidamente al paciente en qué consistía el estudio y cuál era su finalidad, se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los participantes.

A los datos clínicos solo han tenido acceso los facultativos e investigadores del IMIB-HCUVA que han participado en este estudio, asegurando la confidencialidad de los mismos, estableciendo el protocolo pertinente para ello.

IV. RESULTADOS

1 Implementación de un Programa de Control de Calidad en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas

1.1 Control de calidad interno con gestión interna aplicado a la técnica de Quimioluminiscencia de Micropartículas (CMIA)

Los resultados de CMIA (S/CO) obtenidos para el Pool 1 en los diferentes días del estudio (10 días) se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados obtenidos con el Pool 1 en cada uno de los días analizado.

Día	S/CO
1	3,10
2	3,31
3	3,22
4	3,38
5	3,25
6	3,45
7	3,48
8	3,29
9	3,42
10	3,50

El valor medio de S/CO de las mediciones realizadas fue de 3,34, con una desviación estándar de 0,13 y un coeficiente de variación de 3,48%. Se realizó el gráfico de Levey-Jennings para detectar cualquier error sistemático o aleatorio que pudiera estar teniendo lugar mediante el uso de las reglas de Westgard (Figura 17).

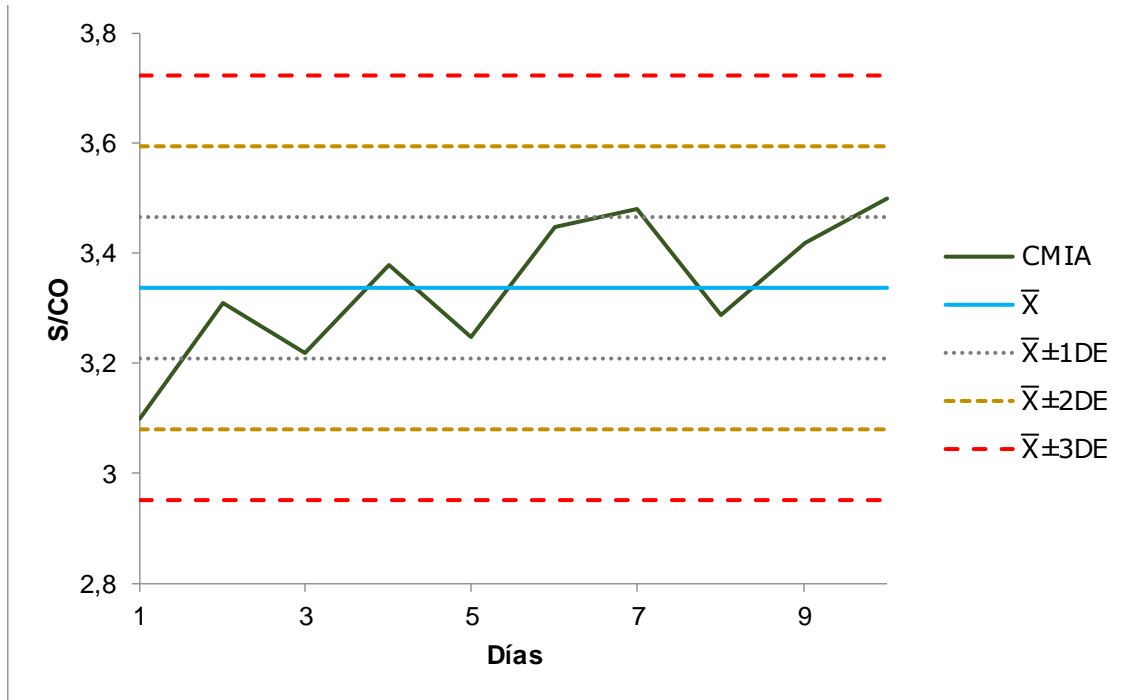


Figura 17. Gráfico de Levey-Jennings obtenido con las mediciones del Pool 1. La línea azul corresponde a la media de los resultados obtenidos y las líneas discontinuas a $\bar{X} \pm 1$ DE, $\bar{X} \pm 2$ DE y $\bar{X} \pm 3$ DE.

El control negativo utilizado (suero de paciente de zona no endémica) fue negativo ($S/CO < 0,9$) en todas las repeticiones realizadas (Tabla 12)

Tabla 12. Resultados obtenidos con el control negativo en cada uno de los días analizado.

Día	S/CO
1	0,02
2	0,02
3	0,02
4	0,02
5	0,02
6	0,02
7	0,02
8	0,04
9	0,03
10	0,07

1.2 Control de calidad externo aplicado a diferentes técnicas serológicas (CMIA, IFI, ICT).

Para llevar a cabo el control de calidad externo de las diferentes técnicas, se emplearon los controles suministrados por el Programa Nacional de Control de Calidad de Brasil (PNCQ1, PNCQ2 y PNCQ3) de los años 2019 y 2021.

Los resultados obtenidos en el año 2019 fueron los siguientes:

- PNCQ1: positivo mediante CMIA en todas las diluciones realizadas (1/64), por IFI positivo hasta la dilución 1/16 y positivo hasta la última dilución (1/64) mediante ICT.
- PNCQ2: resultado negativo en todas las técnicas empleadas.
- PNCQ3: positivo mediante CMIA hasta la última dilución realizada (1/64), por IFI hasta la dilución 1/16 y positivo hasta la última dilución (1/64) mediante ICT.

Los resultados que se obtuvieron en el año 2021 fueron los siguientes:

- PNCQ1: positivo mediante CMIA hasta la dilución 1/16, por IFI hasta la dilución 1/16 y positivo hasta la dilución 1/8 el primer día y 1/2 el segundo día mediante ICT.
- PNCQ2: resultado negativo en todas las técnicas empleadas.
- PNCQ3: positivo mediante CMIA hasta la dilución (1/16), por IFI hasta la dilución 1/8 y positivo mediante ICT hasta la dilución 1/16.

Tabla 13. Resultados obtenidos en los controles del Programa Nacional de Control de Calidad de Brasil (PNCQ) en el año 2019 en las diferentes técnicas serológicas (CMIA, IFI e ICT).

		PNCQ1			PNCQ2			PNCQ3		
	DILUCIONES	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título	ICT
DÍA 1	1	11,04	2560	P	0,12	0	NEG	9,41	640	P
	1/2	9,58	640	P	0,1	0	NR	7,72	640	P
	1/4	7,9	320	P	0,09	NR	NR	6,94	320	P
	1/8	5,92	80	P	0,12	NR	NR	5,33	160	P
	1/16	3,83	80	P	0,13	NR	NR	3,54	80	P
	1/32	2,42	20	P	0,14	NR	NR	2,72	40	P
	1/64	1,37	20	P	0,12	NR	NR	1,74	20	P
		DILUCIONES	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título
DÍA 2	1	11,04	640	P	0,13	NEG	NEG	9,45	640	P
	1/2	9,05	160	P	0,11	NEG	NR	8,65	640	P
	1/4	7,84	80	P	0,1	NR	NR	6,91	320	P
	1/8	5,6	80	P	0,11	NR	NR	5,12	80	P
	1/16	3,87	80	P	0,11	NR	NR	3,79	80	P
	1/32	2,55	40	P	0,14	NR	NR	2,84	40	P
	1/64	1,48	20	P	0,12	NR	NR	1,75	20	P

RESULTADOS

Tabla 14. Resultados obtenidos con los controles del Programa Nacional de Control de Calidad de Brasil (PNCQ) en el año 2021 en las diferentes técnicas serológicas (CMIA, IFI e ICT).

		PNCQ1			PNCQ2			PNCQ3		
	DILUCIONES	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título	ICT
DÍA 1	1	9,65	2560	P	0,08	N	N	8,06	640	P
	1/2	6,92	1280	P	0,06	N	N	5,6	160	P
	1/4	4,67	320	P	0,05	N	NR	3,38	80	P
	1/8	2,38	160	P	0,03	N	NR	2,1	80	P
	1/16	1,38	80	N	0,03	N	NR	1,17	0	P
	1/32	0,67	0	N	0,04	N	NR	0,55	0	N
	1/64	0,33	0	N	0,02	N	NR	0,29	0	N
		DILUCIONES	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título	ICT	S/CO	1/título
DÍA 2	1	9,38	2560	P	0,08	N	N	8,43	640	P
	1/2	6,9	2560	P	0,06	N	N	6,04	320	P
	1/4	4,18	1280	N	0,06	N	NR	3,87	160	P
	1/8	2,49	320	N	0,03	N	NR	2,56	80	P
	1/16	1,4	160	N	0,03	N	NR	1,2	40	PD
	1/32	0,7	0	N	0,02	N	NR	0,53	0	N
	1/64	0,35	40	N	0,02	N	NR	0,28	0	N

Posteriormente, se realizó el cálculo de la media de los valores de S/CO obtenidos por CMIA en cada una de las diluciones en los días 1 y 2 de cada ensayo, así como de su desviación estándar y su coeficiente de variación. Los resultados se detallan en la tabla 15.

Tabla 15. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de los valores obtenidos en las diferentes diluciones en la técnica de CMIA del PNCQ en los años 2019 y 2021.

		2019						2022			
PNCQ1	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV (%)	PNCQ1	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV (%)		
	1	11,04	0,00	0,00		1	9,52	0,19	2,01		
1/2	9,32	0,37	4,02	1/2	6,91	0,01	0,20				
1/4	7,87	0,04	0,54	1/4	4,43	0,35	7,83				
1/8	5,76	0,23	3,93	1/8	2,44	0,08	3,19				
1/16	3,85	0,03	0,73	1/16	1,39	0,01	1,02				
1/32	2,49	0,09	3,70	1/32	0,69	0,02	3,10				
1/64	1,43	0,08	5,46	1/64	0,34	0,01	4,16				
PNCQ2	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV (%)	PNCQ2	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV (%)		
	1	0,13	0,01	5,66		1	0,08	0,00	0,00		
1/2	0,11	0,01	6,73	1/2	0,06	0,00	0,00				
1/4	0,10	0,01	7,44	1/4	0,06	0,01	12,86				
1/8	0,12	0,01	6,15	1/8	0,03	0,00	0,00				
1/16	0,12	0,01	11,79	1/16	0,03	0,00	0,00				
1/32	0,14	0,00	0,00	1/32	0,03	0,01	47,14				
1/64	0,12	0,00	0,00	1/64	0,02	0,00	0,00				
PNCQ3	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV (%)	PNCQ3	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV (%)		
	1	9,43	0,03	0,30		1	8,25	0,26	3,17		
1/2	8,19	0,66	8,03	1/2	5,82	0,31	5,35				
1/4	6,93	0,02	0,31	1/4	3,63	0,35	9,56				
1/8	5,23	0,15	2,84	1/8	2,33	0,33	13,96				
1/16	3,67	0,18	4,82	1/16	1,19	0,02	1,79				
1/32	2,78	0,08	3,05	1/32	0,54	0,01	2,62				
1/64	1,75	0,01	0,41	1/64	0,29	0,01	2,48				

En 2021, se realizó un nuevo control de calidad externo con 2 sueros liofilizados del programa de control de Calidad de la OMS (OMS 09/186 y OMS 09/188) para la evaluación de las técnicas CMIA e IFI.

- El control OMS 09/186 fue positivo hasta la última dilución (1/64) mediante la técnica CMIA y hasta la dilución 1/32 el primer día y 1/16 el segundo día mediante IFI.

RESULTADOS

- El control OMS 09/188 fue positivo hasta la dilución 1/32 el primer día y hasta la última (1/64) el segundo mediante CMIA y hasta la dilución 1/16 ambos días mediante IFI. Los resultados detallados se muestran en la tabla 16.

Tabla 16. Resultados obtenidos en el Programa de control de Calidad de la OMS (OMS 09/186 y OMS 09/188) realizado en el año 2021 mediante las técnicas serológicas CMIA e IFI.

	DILUCIONES	OMS 09/186		OMS 09/188	
		S/CO	1/título	S/CO	1/título
DÍA 1	1	9,76	2560	8,37	2560
	1/2	8,13	640	6,92	1280
	1/4	6,85	320	5,86	640
	1/8	6,2	320	3,74	320
	1/16	4,09	160	2,83	160
	1/32	2,74	80	1,69	40
	1/64	1,52	40	0,99	0
		DILUCIONES	S/CO	1/título	S/CO
DÍA 2	1	NM*	2560	8,42	2560
	1/2	8,82	640	8,51	320
	1/4	7,37	320	NM*	160
	1/8	7,29	160	NM*	80
	1/16	6,05	80	4,61	80
	1/32	3,76	40	2,72	0
	1/64	1,74	0	1,09	0

*NM: No muestra

Posteriormente, se realizó el cálculo de la media de los resultados de CMIA en cada una de las diluciones de los 2 controles de la OMS entre los días 1 y 2 del ensayo, así como de su desviación estándar y su coeficiente de variación. Los resultados se detallan en la tabla 17.

Tabla 17. Media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación de los valores obtenidos en las diferentes diluciones realizadas por la técnica CMIA.

OMS 09/186	DILUCIONES	S/CO	D. EST	CV
	1	NA*	NA*	NA*
	1/2	8,48	0,49	5,76
	1/4	7,11	0,37	5,17
	1/8	6,75	0,77	11,43
	1/16	5,07	1,39	27,34
	1/32	3,25	0,72	22,19
	1/64	1,63	0,16	9,54
	OMS 09/188	DILUCIONES	S/CO	D. EST
1		8,40	0,04	0,42
1/2		7,72	1,12	14,57
1/4		NA*	NA*	NA*
1/8		NA*	NA*	NA*
1/16		3,72	1,26	33,83
1/32		2,21	0,73	33,03
1/64		1,04	0,07	6,80

*NA: No aplica

2 Relación entre los títulos de IFI y los valores de CMIA para el seguimiento de la Enfermedad de Chagas

2.1 Determinación del rango de linealidad de la técnica de quimioluminiscencia (CMIA) en el ensayo Architect CHAGAS®

Se realizó un estudio con un “pool” de 3 sueros pertenecientes a pacientes diagnosticados de ECC (Pool 2) con valores de S/CO > 10 (Rango: 10,95-12,5) obtenidos mediante quimioluminiscencia (CMIA) con el fin de determinar el rango de valores en los que la técnica muestra un comportamiento lineal.

El pool de sueros se analizó por triplicado obteniéndose un valor de S/CO medio de $11,4 \pm 0,37$ con un coeficiente de variación de 3,21%. A continuación, se realizaron diluciones seriadas a 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 y se analizaron por triplicado. Los resultados se recogen en la tabla 18 y figura 18.

Tabla 18. Valores medios de S/CO de cada una de las diluciones del pool 2 de sueros.

DILUCIONES	(\bar{x}) S/CO	D.EST	CV
1	11,4	0,37	3,21%
1/10	6,92	0,14	1,95%
1/20	5,73	0,14	2,48%
1/40	3,94	0,16	4,05%
1/80	2,33	0,10	4,48%
1/160	1,31	0,04	3,09%
1/320	0,63	0,04	6,92%

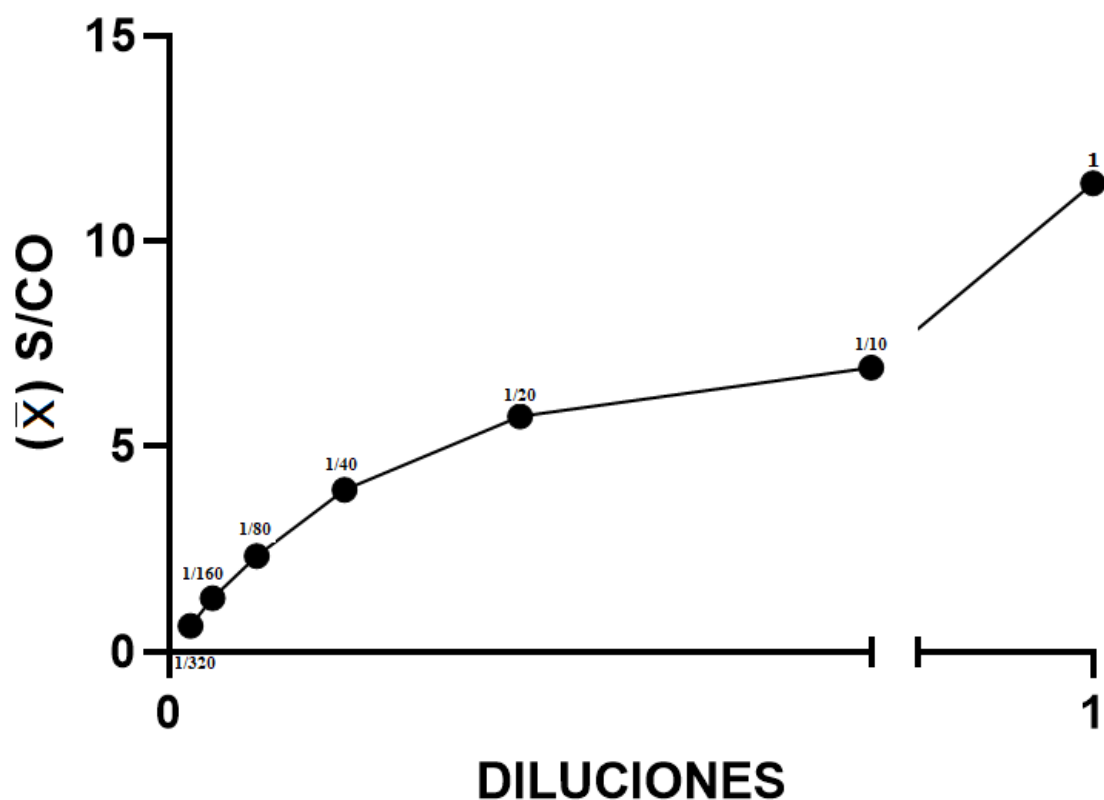


Figura 18. Valores de S/CO en función de la dilución del pool de sueros de pacientes. Las fracciones que se encuentran en cada punto corresponden a la dilución (eje de ordenadas) de cada resultado.

Con estos mismos datos se calculó la línea de tendencia de las diferentes diluciones encontrándose linealidad ($R^2 \geq 0,99$) en el rango de valores de S/CO comprendidos entre 1,31-3,94 (Figura 19).

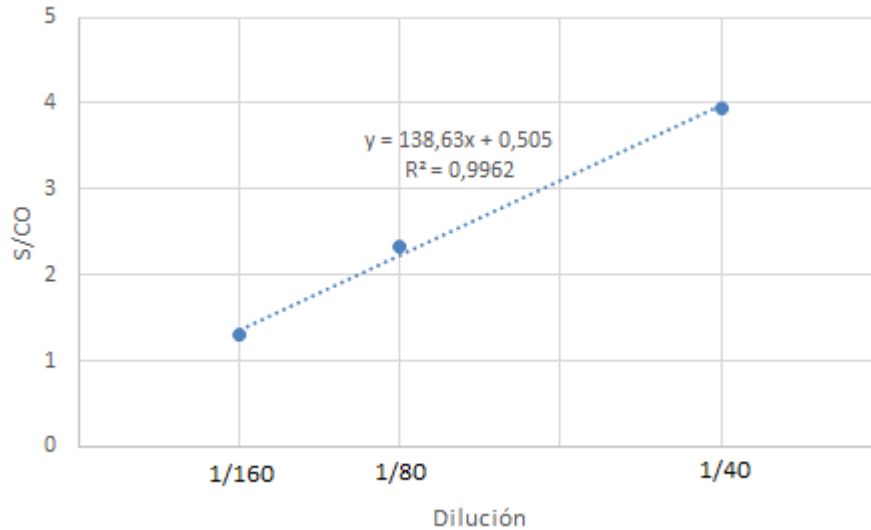


Figura 19. Representación de la recta de calibrado de los valores de S/CO comprendidos entre las diluciones 1/40 y 1/160 del pool 2 de sueros de pacientes con EC.

Si aumentamos el valor de S/CO por encima de 3,94 a 5,73 (dilución 1/20), se pierde la linealidad de la recta obteniéndose una recta de calibrado con $R^2=0,97$ (Figura 20)

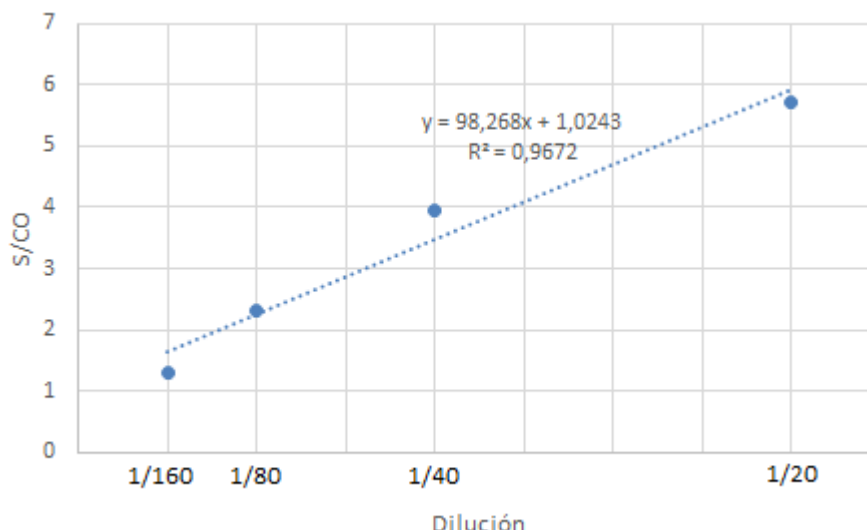


Figura 20. Pérdida de linealidad de la recta de calibrado al incorporar valores de S/CO > 3,94.

2.2 Determinación de la relación existente entre los valores S/CO obtenidos por CMIA y el título de anticuerpos mediante IFI.

Se llevó a cabo un estudio con el pool de sueros del apartado anterior (Pool 2) y con 2 pools de sueros más con el fin de establecer la posible relación entre el valor de S/CO (CMIA) y el título de anticuerpos IgM/IgG anti-*T. cruzi* (IFI). Para ello, se realizó el estudio de los 3 pools de sueros por triplicado mediante CMIA a las siguientes diluciones: sin diluir y a diluciones de 1:2, 1:4, 1:8, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320. Posteriormente, se titularon los anticuerpos de los pools sin diluir y de cada una de las diluciones anteriores mediante IFI. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 19 y en la figura 21.

Tabla 19. Resultados obtenidos mediante CMIA e IFI en las diferentes diluciones de los pools de sueros con anticuerpos para *T. cruzi*

DILUCIONES	POOL 1		POOL 2		POOL 3	
	(\bar{X}) S/CO	1/título	(\bar{X}) S/CO	1/título	(\bar{X}) S/CO	1/título
1	11,4	2560	10,95	2560	13,07	2560
1/2	10,28	1280	10,58	1280	11,54	1280
1/4	8,66	640	8,97	640	9,37	640
1/8	7,69	320	8,2	320	7,65	320
1/10	6,92	320	7,5	320	NR	NR
1/20	5,73	160	6,07	160	5,23	80
1/40	3,94	40	4,15	40	3,33	40
1/80	2,33	40	2,46	20	1,78	20
1/160	1,31	0	1,35	0	0,79	20
1/320	0,63	0	0,64	0	0,32	0

*NR: No realizada.

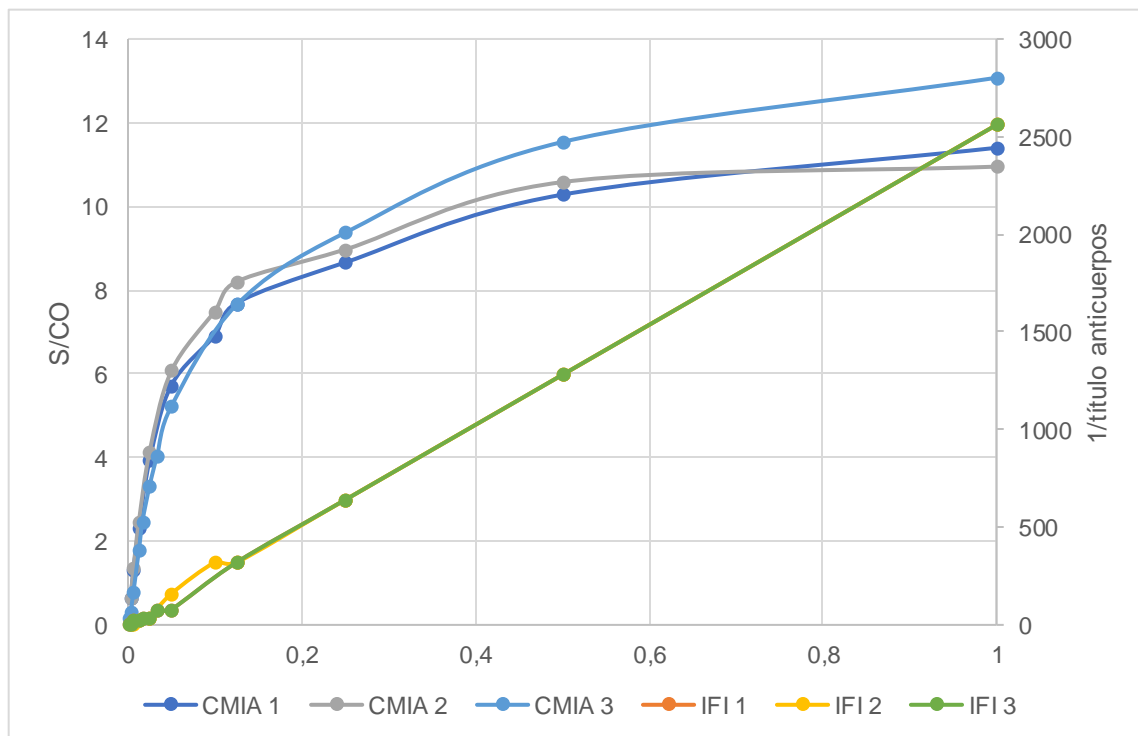


Figura 21. Representación gráfica de los valores obtenidos mediante CMIA e IFI de las diluciones del pool 1, 2 y 3. El eje de ordenadas izquierdo corresponde a los valores de S/CO y el derecho a los valores de IFI. Nótese el solapamiento de los valores de IFI de los 3 pools de anticuerpos en la figura.

RESULTADOS

Posteriormente, se calculó el porcentaje de variación entre diluciones seriadas (1/2), obteniéndose un menor porcentaje de variación a valores de CMIA elevados (5,73-11,4) y un porcentaje cercano al 50% en valores de CMIA bajos (1,31-3,94). En cuanto a los resultados de la IFI, la mayoría obtuvo un porcentaje de variación del 50% (tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de variación entre diluciones seriadas 1/2.

Diluciones	% variación POOL 1		% variación POOL 2		% variación POOL 3	
	CMIA	IFI	CMIA	IFI	CMIA	IFI
1-1/2	10%	50%	3%	50%	12%	50%
1/2-1/4	16%	50%	15%	50%	19%	50%
1/4-1/8	11%	50%	9%	50%	18%	50%
1/10-1/20	17%	50%	19%	50%	NR	NR
1/20-1/40	31%	25%	32%	25%	36%	50%
1/40-1/80	41%	100%	41%	50%	47%	50%
1/80-1/160	44%	0%	45%	0%	56%	0%

Por último, se calculó el rango de valores de S/CO que equivaldría a los títulos de anticuerpos obtenidos mediante IFI; para ello se utilizó la media de los resultados de S/CO correspondiente a cada título de anticuerpos \pm DE (Tabla 21).

Tabla 21. Relación entre los títulos de anticuerpos obtenidos mediante IFI y el valor de S/CO.

\bar{X} S/CO	Desviación Estandar (DE)	Coficiente de Variación (CV)	IFI	Rango S/CO
11,81	1,12	3,95%	1/2560	12,92-10,69
10,80	0,66	6,04%	1/1280	11,46-10,14
9,00	0,36	4,07%	1/640	9,36-8,64
7,51	0,45	3,95%	1/320	7,97-7,06
5,90	0,24	6,04%	1/160	6,14-5,66
3,44	0,82	3,95%	1/40	4,25-2,62
2,12	0,48	6,04%	1/20	2,60-1,64

3 Evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas

3.1 Evaluación del Límite de Detección (LOD) de diferentes técnicas de biología molecular

Para evaluar el LOD de las técnicas de biología molecular, se empleó ADN de *T. cruzi* purificado [AMPLIRUN® TRYPANOSOMA DNA CONTROL (Vircell, España)], conteniendo 19.000 copias/μl de genoma completo de *T. cruzi* Tc11b (cepa Y).

El estándar y sus diluciones se analizaron en paralelo mediante 3 técnicas moleculares con diferentes dianas (ADN kinetoplasto o ADN satélite):

- PCR convencional “*in house*” (ADNk)
- PCR a tiempo real de la casa comercial Progenie® (ADNsat)
- PCR a tiempo real de la casa comercial Altona® (ADNk)

PCR convencional “*in house*” (PCR “*in house*”)

La PCR “*in house*” fue positiva en todos los replicados analizados hasta una concentración límite de $1,9 \times 10^{-3}$ copias/μL (Figura 22). A una concentración de $1,9 \times 10^{-4}$ copias/μL sólo amplificaron 5 de los 10 replicados y a $1,9 \times 10^{-5}$ copias/μL sólo 1 de ellos. A concentraciones más bajas ($1,9 \times 10^{-6}$ y $1,9 \times 10^{-7}$ copias/μL) no amplificó ningún replicado. En el carril 20 de cada una de las filas se añadió un marcador de peso molecular (100-1500pb) para comprobar que el amplicón obtenido era del tamaño indicado (330pb).

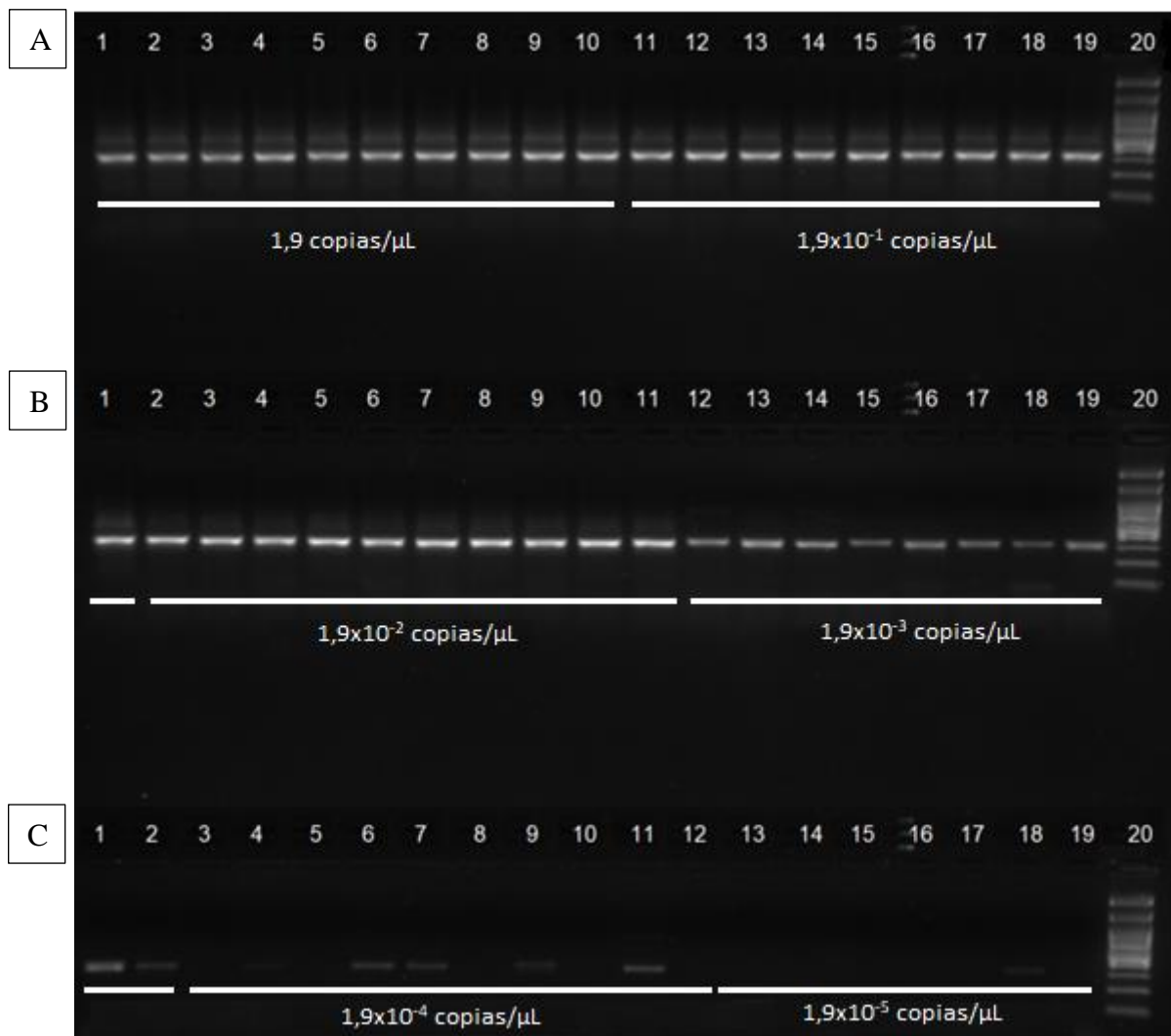


Figura 22. Resultados obtenidos mediante la PCR *“in house”* **A)** Calle 1-10: concentración $1,9 \times 10$ copias/ μL ; calles 11-19: concentración $1,9 \times 10^{-1}$ copias/ μL ; calle 20: Peso molecular (100-1500 pb). **B)** Calle 1: concentración $1,9 \times 10^{-1}$ copias/ μL ; calles 2-11: concentración $1,9 \times 10^{-2}$ copias/ μL ; calles 12-19: concentración $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μL ; calle 20: Peso molecular (100-1500 pb). **C)** Calles 1-2: concentración $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μL ; calles 3-12: concentración $1,9 \times 10^{-4}$ copias/ μL ; calles 13-19: concentración $1,9 \times 10^{-5}$ copias/ μL ; calle 20: Peso molecular (100-1500 pb).

RT-PCR de la casa comercial Progenie (PCR-Pro)

La PCR-Pro fue positiva en todos los replicados realizados hasta una concentración límite de $1,9 \times 10^{-2}$ copias/ μL (Figura 23). A una concentración de $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μL solo amplificaron 6 de los 10 replicados y a $1,9 \times 10^{-4}$ copias/ μL sólo 2 de ellos.

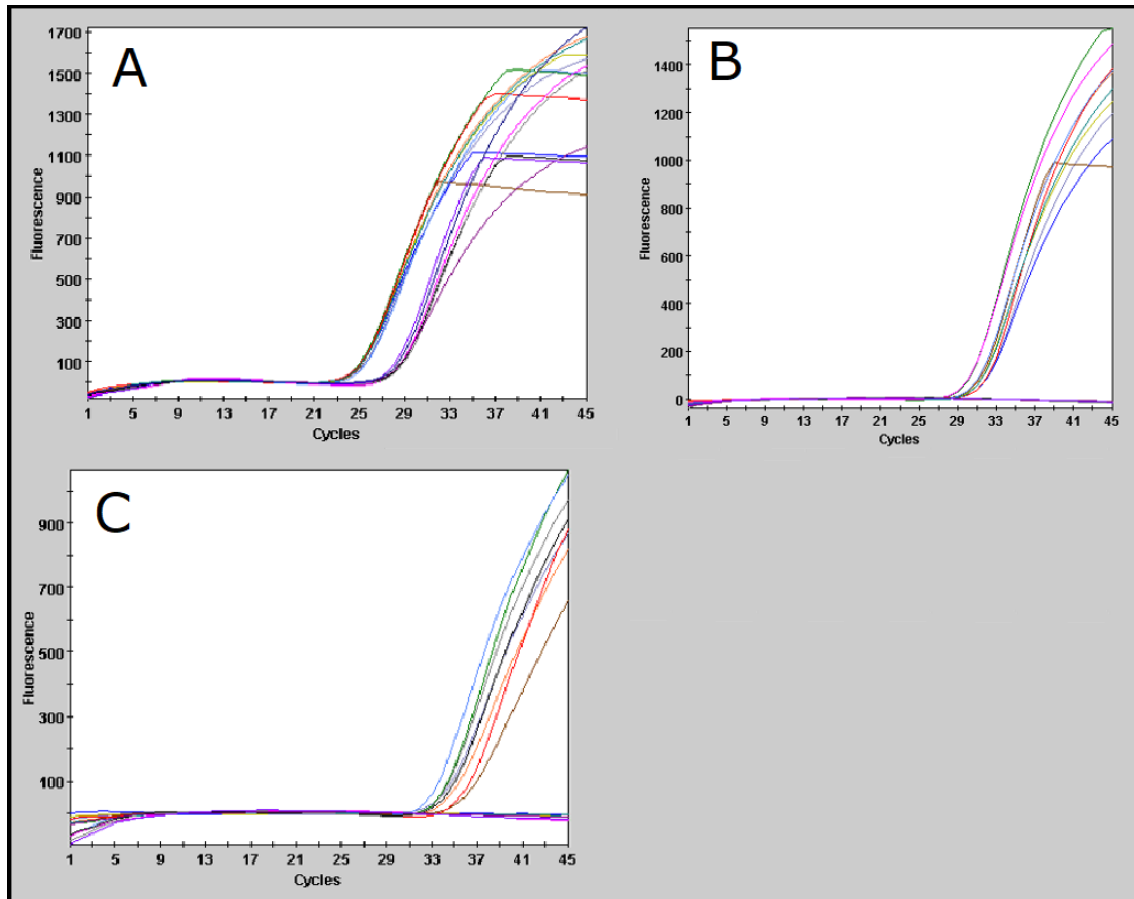


Figura 23. Resultados obtenidos mediante la PCR-Pro a diferentes concentraciones. A) Gráficos obtenidos a las concentraciones de 1,9 y $1,9 \times 10^{-1}$ copias/ μ L. B) Gráfico obtenido a la concentración de $1,9 \times 10^{-2}$ copias/ μ L. C) Gráfico obtenido a la concentración de $1,9 \times 10^{-3}$ y $1,9 \times 10^{-4}$ copias/ μ L. En esta última carrera se puede observar que solo amplificaron 8 replicados, 6 a una concentración de $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μ L y 2 a $1,9 \times 10^{-4}$ copias/ μ L.

RT-PCR de la casa comercial Altona (PCR-Alt)

La PCR-Alt fue positiva en todos los replicados realizados hasta una concentración límite de $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μ L (Figuras 22 y 23). A una concentración de $1,9 \times 10^{-4}$ copias/ μ L sólo amplificaron 5 de los 10 replicados y a concentraciones más bajas ($1,9 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-7}$ copias/ μ L) no amplificó ningún replicado.

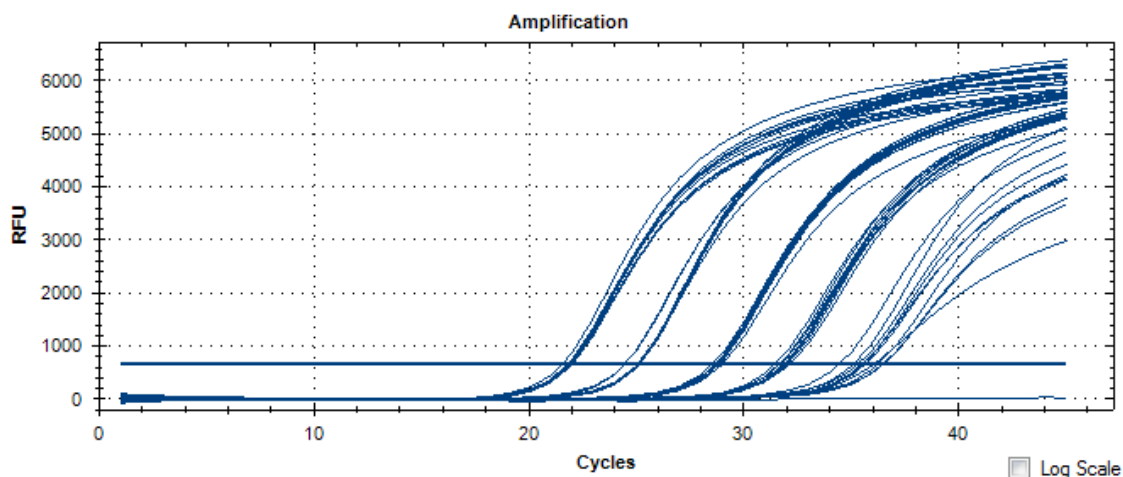


Figura 24. Resultados obtenidos mediante la PCR-Alt a concentraciones de 19 copias/ μL hasta $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μL .

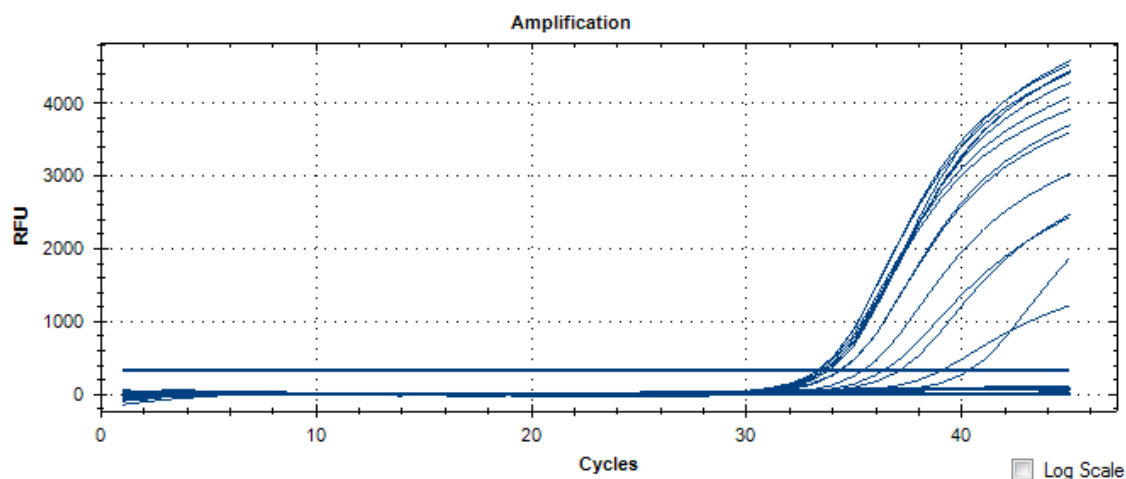


Figura 25. Resultados obtenidos mediante la PCR-Alt a concentraciones de $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μL y $1,9 \times 10^{-7}$ copias/ μL . Sólo amplificaron 5 de los 10 replicados a $1,9 \times 10^{-4}$ copias/ μL y ninguno a concentraciones más bajas ($1,9 \times 10^{-5}$ a $1,9 \times 10^{-7}$ copias/ μL).

Por último, se realizó una tabla en la que se incluyeron los resultados de las diferentes PCRs, así como el número de replicados positivos en cada una de las concentraciones y la media de los Cts de las PCRs a tiempo real (Tabla 22).

Tabla 22. Sensibilidad analítica de las diferentes técnicas de biología molecular. Se muestran el número de replicados positivos por cada técnica según la concentración de ADN del parásito, así como la media de los Cts en las PCRs a tiempo real.

Concentración (copias/ μ l)	Replicados	Positivos PCR-Alt	Media Ct PCR-Alt	Índice de éxito (%)	Positivos PCR-Pro	Media Ct PCR-Pro	Índice de éxito (%)	Positivos PCR-In house	Índice de éxito (%)
19	10	10	21,93	100%	NR	NR	NR	NR	NR
1,9	10	10	24,99	100%	10	23,99	100%	10	100%
$1,9 \times 10^{-1}$	10	10	28,78	100%	10	27,37	100%	10	100%
$1,9 \times 10^{-2}$	10	10	31,89	100%	10	29,95	100%	10	100%
$1,9 \times 10^{-3}$	10	10	35,70	100%	6	33,73	60%	10	100%
$1,9 \times 10^{-4}$	10	5	37,62	50%	2	33,35	20%	5	50%
$1,9 \times 10^{-5}$	10	0	0	0%	NR	NR	NR	1	10%
$1,9 \times 10^{-6}$	10	0	0	0%	NR	NR	NR	0	0%
$1,9 \times 10^{-7}$	10	0	0	0%	NR	NR	NR	0	0%

3.2 Comparativa de diferentes técnicas de biología molecular (PCR) en muestras clínicas

Para realizar la comparativa entre las diferentes técnicas de biología molecular se emplearon 91 muestras de sangre total de pacientes diagnosticados de EC y niños nacidos de madres con EC (material y métodos, apartado 2.3).

Las 91 muestras se analizaron mediante 4 técnicas moleculares con diferentes dianas (ADN kinetoplasto o ADN satélite):

- PCR convencional “*in house*” (ADNk)
- PCR a tiempo real de la casa comercial Progenie® (ADNsat)
- PCR a tiempo real de la casa comercial Altona® (ADNk)
- qPCR a tiempo real “*in house*” (ADNk).

El método convencional “*in house*” fue positivo en 58 de las 91 muestras analizadas (63,7%). Dado que este método es el usado por nuestro grupo de investigación desde el año 2010 y es conocido por su alta sensibilidad (Wincker *et al.*, 1994, Gomes *et al.*, 1998), es el que se ha utilizado como método de referencia para el cálculo de la sensibilidad y especificidad de los kits comerciales, así como para la PCR cuantitativa (qPCR).

RT-PCR de la casa comercial Progenie (PCR-Pro)

La RT-PCR de la casa comercial Progenie® fue positiva en 51 de las 58 muestras consideradas como positivas (87,9%) y negativa en 27 de las 33 muestras consideradas como negativas (81,8%). Para el cálculo de los parámetros estadísticos se realizó una tabla de contingencia obteniéndose una sensibilidad del 87,9%, una especificidad del 81,8%, un valor predictivo positivo de 89,5% y un valor predictivo negativo de 79,4%. El índice *Kappa* entre las dos técnicas fue de 0,69 (concordancia sustancial).

Tabla 23. Tabla de contingencia de las muestras analizadas mediante PCR a tiempo real de la casa comercial Progenie®

		PCR "in house"		
		POS	NEG	
PCR-Pro	POS	51	6	57
	NEG	7	27	34
	Total	58	33	91

Tabla 24. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice *kappa* de la PCR a tiempo real de la casa comercial Progenie®.

	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Índice <i>Kappa</i>
PCR-Pro	87,9 (77,1-94)	81,8 (65,6-91,4)	89,5 (78,9-95,1)	79,4 (63,2-89,7)	0,69 (0,54-0,85)

De las 7 muestras consideradas positivas que no amplificaron por PCR-Pro, 5 muestras pertenecían a pacientes con ECC sin tratamiento previo conocido, 1 era una muestra de un control de 8 años postratamiento (benznidazol 30 días 5mg/kg) y el último correspondía a un niño diagnosticado de ECC. Se repitió la PCR-Pro en las 7 muestras obteniéndose el mismo resultado (Tabla 25).

En cuanto a los 6 falsos positivos, 4 correspondían a pacientes con EC no tratados, 1 era un control de 420 días postratamiento y el último correspondía a un niño de 11 meses de madre con EC que no estaba infectado.

En 5 de las 6 muestras discordantes se repitió la PCR-Pro, obteniéndose 2 resultados negativos y 3 positivos (Tabla 23). En el caso del niño de 11 meses no quedaba más muestra disponible para la repetición.

Tabla 25. Resultados discordantes entre ambas PCR (PCR “in house” y PCR-Pro)

Paciente	PCR “in house”	PCR –Pro	Ct	Repetición	Ct
1	N	P	33,4	P	32,7
2	N	P	37,5	P	32,2
3	N	P	36,4	N	-
4	N	P	31,6	P	34,8
5	N	P	30,9	N	-
6	N	P	38,7	NR*	NR*
7	P	N	-	N	-
8	P	N	-	N	-
9	P	N	-	N	-
10	P	N	-	N	-
11	P	N	-	N	-
12	P	N	-	N	-
13	P	N	-	N	-

*NR: No realizada

RT-PCR de la casa comercial Altona (PCR-Alt)

La PCR de la casa comercial Altona® fue positiva en 32 de las 58 muestras consideradas como positivas (55,2%) y negativa en las 33 muestras consideradas como negativas (44,8%). Se obtuvo una sensibilidad del 55,2%, una especificidad del 100%, un valor predictivo positivo del 100% y un valor predictivo negativo del 55,9%. El índice Kappa entre las dos técnicas fue de 0,47 (concordancia moderada).

Tabla 26. Tabla de contingencia de las muestras analizadas mediante PCR a tiempo real de la casa comercial Altona® (ADNk).

		PCR “in house”		
		POS	NEG	
PCR-Alt	POS	32	0	32
	NEG	26	33	59
	Total	58	33	91

Tabla 27. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice kappa de la PCR a tiempo real de la casa comercial Altona® (ADNk).

	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Índice Kappa
PCR-Alt	55,2 (42,5-67,3)	100 (89,3-100)	100 (89,6-100)	55,9 (43,3-67,8)	0,47 (0,30-0,64)

De las 26 muestras que no amplificaron, 21 pertenecían a pacientes con EC crónica no tratados, 3 eran casos de Chagas congénito, 1 embarazada en el momento del parto y un control de 7 años postratamiento.

RT-PCR cuantitativa “in house” (qPCR)

La qPCR “in house” fue realizada en 57 de las 91 muestras de los pacientes con EC. De estas 57 muestras, 40 fueron consideradas positivas y 17 negativas siguiendo los criterios previamente descritos. La qPCR fue positiva en 39 de las 40 muestras consideradas positivas (97,5%) y negativa en 13 de las 17 muestras consideradas como negativas (76,5%). Se obtuvo una sensibilidad de 97,5%, una especificidad de 76,5%, un valor predictivo positivo de 90,7% y un valor predictivo negativo de 92,9%. El índice Kappa entre las dos técnicas fue de 0,78 (concordancia sustancial).

Tabla 28. Tabla de contingencia de las muestras analizadas mediante la qPCR “in house” (ADNk).

qPCR “in house”	PCR “in house”		
	POS	NEG	
POS	39	4	43
NEG	1	13	14
Total	40	17	57

Tabla 29. Valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo e índice kappa de la qPCR “in house” (ADNk).

	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Índice Kappa
qPCR	97,5	76,5	90,7	92,9	0,78
“in house”	(87,1-99,6)	(87,1-99,6)	(78,4-96,3)	(68,5-98,7)	(0,59-0,96)

La muestra que no amplificó correspondía a un caso de Chagas congénito.

De las 4 muestras consideradas negativas que amplificaron por la qPCR, 2 correspondían a controles 1 año postratamiento, otra a dos años postratamiento y la última a una gestante no tratada (Tabla 30).

Tabla 30. Muestras con resultado negativo por el método de referencia que amplificaron por la qPCR “in house”.

Muestra	PCR referencia	qPCR	Ct	Repetición	Ct
1	NEG	POS	37,5	POS	32,7
2	NEG	POS	37,1	NR	NR
3	NEG	POS	35,6	NR	NR
4	NEG	POS	37	NR	NR

Comparación de las diferentes técnicas moleculares

De las 3 PCR evaluadas, la que mejor concordancia obtuvo con la PCR de referencia fue la qPCR “in house” (índice Kappa 0,78), seguido de la PCR a tiempo real de Progenie (índice Kappa 0,69) y por último la PCR a tiempo real de Altona (índice Kappa 0,47). Los resultados de las diferentes técnicas evaluadas se muestran en la tabla 31.

Tabla 31. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo, valor predictivo positivo e índice *Kappa* de las PCR evaluadas con respecto a la PCR de referencia (PCR “in house”).

	POS N=58	Sensibilidad (IC 95%)	NEG N=33	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)	Índice <i>Kappa</i>
PCR-Pro	51/58	87,9 (77,1-94)	27/33	81,8 (65,6-91,4)	89,5 (78,9-95,1)	79,4 (63,2-89,7)	0,69 (0,54-0,85)
PCR-Alt	32/58	55,2 (42,5-67,3)	33/33	100 (89,3-100)	100 (89,6-100)	55,9 (43,3-67,8)	0,47 (0,30-0,64)
qPCR*	39/40	97,5 (87,1-99,6)	13/17	76,5 (87,1-99,6)	90,7 (78,4-96,3)	92,9 (68,5-98,7)	0,78 (0,59-0,96)

*Cálculos realizados con 57 de las 91 muestras del estudio

Se compararon las medias de los ciclos umbral (Ct) de las 3 PCR a estudio observándose una $\bar{X} \pm SD$ de $31,41 \pm 2,52$ para la PCR-Alt, $32,28$ para la PCR-Pro y $30,82 \pm 3,44$ para qPCR, no encontrándose diferencias significativas entre ellas ($p = 0,11$) (Figura 26).

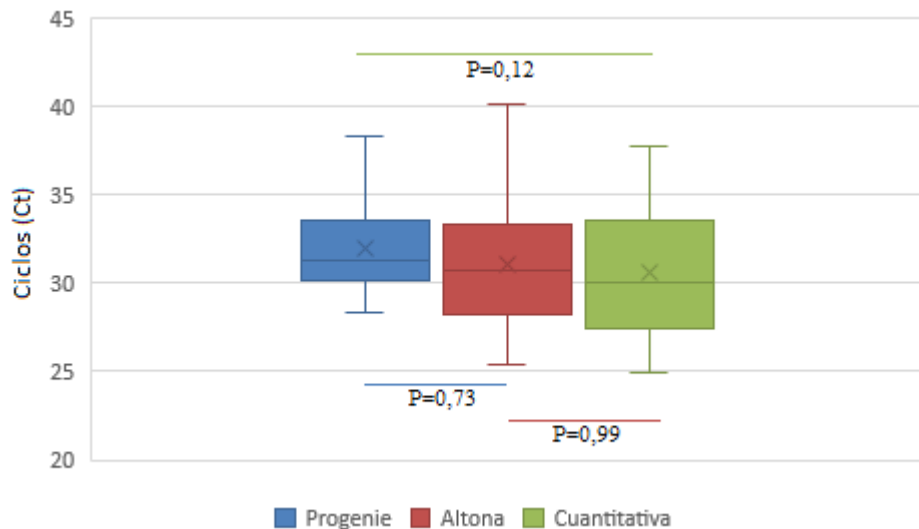


Figura 26. Comparativa de las medias de los ciclos umbral obtenidos en las muestras positivas para *T. cruzi* de las diferentes técnicas moleculares. La línea central de cada caja representa la media aritmética de cada grupo y los bigotes su desviación estándar.

Posteriormente, se calculó el índice *kappa* de todas las pruebas diagnósticas entre sí para obtener la correlación existente entre cada una de las pruebas (Tabla 32).

Tabla 32. Índice *Kappa* de todas las PCR evaluadas entre sí.

	PCR "in house"	PCR-Pro	PCR-Alt	qPCR "in house"
PCR "in house"	1			
PCR-Pro	0,69	1		
PCR-Alt	0,47	0,45	1	
qPCR "in house"	0,78	0,68	0,47	1

Para terminar, se comprobó si los resultados discordantes con respecto a la PCR de referencia (PCR "in house") se habían obtenido por otra de las técnicas de PCR. Veinte muestras de las 26 no amplificadas por PCR-Alt fueron positivas tanto por la PCR "in house" como por la PCR-Pro (tabla 20). De las 6 muestras que amplificaron por PCR "in house" y no por las PCR comerciales, 4 amplificaron también por la PCR cuantitativa (tabla 33). Por último, las 2 muestras restantes que sólo amplificaron por la PCR "in house" correspondían a un caso de Chagas congénito y a una paciente con EC crónica no tratada.

Tabla 33. Resultados discordantes entre la PCR “in house” y las demás técnicas moleculares

	Nº Mta	PCR “in house”	PCR-Pro	Ct	PCR-Alt	Ct	qPCR	Ct
FALSOS NEGATIVOS	8	P	P	38	N	-	P	34,9
	11	P	P	34,5	N	-	P	30,1
	13	P	P	31,9	N	-	P	34,9
	20	P	P	33,2	N	-	P	32
	21	P	P	32,4	N	-	P	32,5
	22	P	P	32,3	N	-	P	35
	29	P	P	34,3	N	-	P	31,9
	30	P	P	34,4	N	-	P	34,9
	44	P	N	-	P	43,9	P	33,5
	45	P	N	-	N	-	P	36,8
	46	P	N	-	N	-	P	37,5
	47	P	N	-	N	-	P	37,7
	48	P	N	-	N	-	P	35,6
	49	P	N	-	N	-	N	-
	59	P	P	32,1	N	-	NR	NR
	60	P	P	32,1	N	-	NR	NR
	61	P	P	32,5	N	-	NR	NR
	64	P	P	33,7	N	-	NR	NR
	65	P	P	29,9	N	-	NR	NR
	66	P	P	33,4	N	-	NR	NR
	67	P	P	32,1	N	-	NR	NR
	68	P	N	-	N	-	NR	NR
	69	P	P	31,2	N	-	NR	NR
	70	P	P	32,7	N	-	NR	NR
84	P	P	33,7	N	-	NR	NR	
86	P	P	30,7	N	-	NR	NR	
96	P	P	31,7	N	-	NR	NR	
FALSOS POSITIVOS	26	N	P	33,4	N	-	P	37,5
	31	N	P	38,7	N	-	N	-
	62	N	P	37,5	N	-	NR	NR
	74	N	P	30,9	N	-	NR	NR
	77	N	P	36,4	N	-	NR	NR
	92	N	P	31,6	N	-	NR	NR

3.3 Comparativa de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas congénita

Para este punto se empleó una cohorte de 71 muestras de gestantes y niños del apartado anterior. Las 71 muestras corresponden a 58 gestantes no tratadas, 13 recién nacidos de madres con EC y 2 muestras de un niño de 7 y otro de 9 años nacidos en España que no habían viajado a zona endémica.

De las 71 muestras, 51 fueron consideradas como positivas (71,8%) y 20 negativas (28,2%) según el método de referencia del apartado anterior.

Los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de estas muestras se calcularon para las diferentes técnicas moleculares siguiendo el esquema del apartado anterior (Tabla 34).

Tabla 34. Sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de las diferentes técnicas de biología molecular en el grupo de madres y niños usando la PCR convencional “*in house*” como método de referencia.

	Sensibilidad (IC 95 %)	Especificidad (IC 95 %)	VPP (IC 95 %)	VPN (IC 95 %)	Índice K (IC 95 %)	Ct medio
PCR-Pro	88,2 (76,6-94,5)	75,0 (53,1-88,8)	90 (78,6-95,7)	71,4 (50,0-86,2)	0,62 (0,42-0,83)	32,63± 2,54
PCR-Alt	56,9 (43,3-69,5)	100,00 (83,9-100,0)	100,00 (88,3-100,0)	47,6 (33,4-62,3)	0,43 (0,23-0,63)	31,11 ± 4,38
qPCR*	97,4 (86,5-99,5)	84,6 (57,8-95,7)	94,9 (83,1-98,6)	91,7 (64,6-98,5)	0,84 (0,67-1)	30,93± 3,74

*Cálculos realizados con 51 de las 71 muestras del estudio.

Como se puede observar, el índice Kappa de los reactivos de las casas comerciales Progenie y Altona disminuye sin modificar su interpretación (0,62 y 0,43, respectivamente), pero el índice de concordancia de la qPCR aumenta hasta un valor de 0,84, modificando la interpretación del índice a “concordancia sustancial”.

Tabla 35. Comparación de los índices *kappa* de las diferentes técnicas calculadas con la cohorte madres-niños y con el total de las muestras.

	Cohorte madres y niños (N=71)		Total de muestras (N=91)	
	PCR-Pro	0,62	Concordancia moderada	0,69
PCR-Alt	0,43	Concordancia mediana	0,47	Concordancia mediana
qPCR “in house”	0,84	Concordancia sustancial	0,78	Concordancia moderada

4 Utilidad de la Quimioluminiscencia de micropartículas en el diagnóstico de Chagas congénito.

Se realizó un estudio serológico con el ensayo ARCHITECT Chagas® en 75 niños nacidos de 72 mujeres con EC crónica. Al nacimiento, la media de los valores de CMIA representados como S/CO fue de 8,78 en los 75 recién nacidos y de 8,74 en sus madres. No se encontraron diferencias significativas entre ambas medias ($p=0,84$).

Al finalizar el seguimiento, 74 de los 75 niños se consideraron no infectados (tanto los resultados de CMIA como los de IFI negativizaron) mientras que 1 niño fue diagnosticado de ECC (CMIA e IFI positivas al 10º mes de vida y la PCR fue positiva a los 14 meses de vida).

4.1 Aclaramiento de anticuerpos maternos en niños no infectados

Los 74 niños no infectados se clasificaron en 3 grupos atendiendo al tiempo de seronegativización por CMIA:

- A) Pacientes que negativizaron a los 6 meses de vida.
- B) Pacientes que negativizaron a los 9 meses de vida.
- C) Pacientes que negativizaron a los 12 meses de vida.

El seguimiento serológico realizado en los 74 niños mostró una disminución mantenida de los anticuerpos maternos hasta su completa negativización. El ensayo CMIA negativizó en 18 niños a los 6 meses de vida (grupo A), en 24 niños a los 9 meses de vida (grupo B) y en 32 niños a los 12 meses de vida (grupo C). La media de los valores de CMIA de cada grupo en cada uno de los controles se muestra en la tabla 36.

Tabla 36. Media de los valores del seguimiento serológico de los niños no infectados y sus madres medida mediante CMIA y número de muestras recogidas de cada grupo según el tiempo de seronegativización.

Edad	Madres (\bar{X} S/CO \pm SD)	0-2 meses (\bar{X} S/CO \pm SD)	6 meses (\bar{X} S/CO \pm SD)	9 meses (\bar{X} S/CO \pm SD)	12 meses (\bar{X} S/CO \pm SD)
Grupo A (N=18)	7,06 \pm 2,09	6,64 \pm 1,99	0,43 \pm 0,32	*	*
Grupo B (N=24)	9,47 \pm 1,28	9,44 \pm 2,27	2,77 \pm 1,25	0,40 \pm 0,25	*
Grupo C (N=32)	9,98 \pm 2,41	9,61 \pm 2,35	3,68 \pm 2,60 (N=24)	1,70 \pm 0,76 (N=10)	0,14 \pm 0,19

*Fin del seguimiento.

Las gráficas del aclaramiento de anticuerpos de los grupos A, B y C se muestran en las figuras 27, 28 y 29 respectivamente.

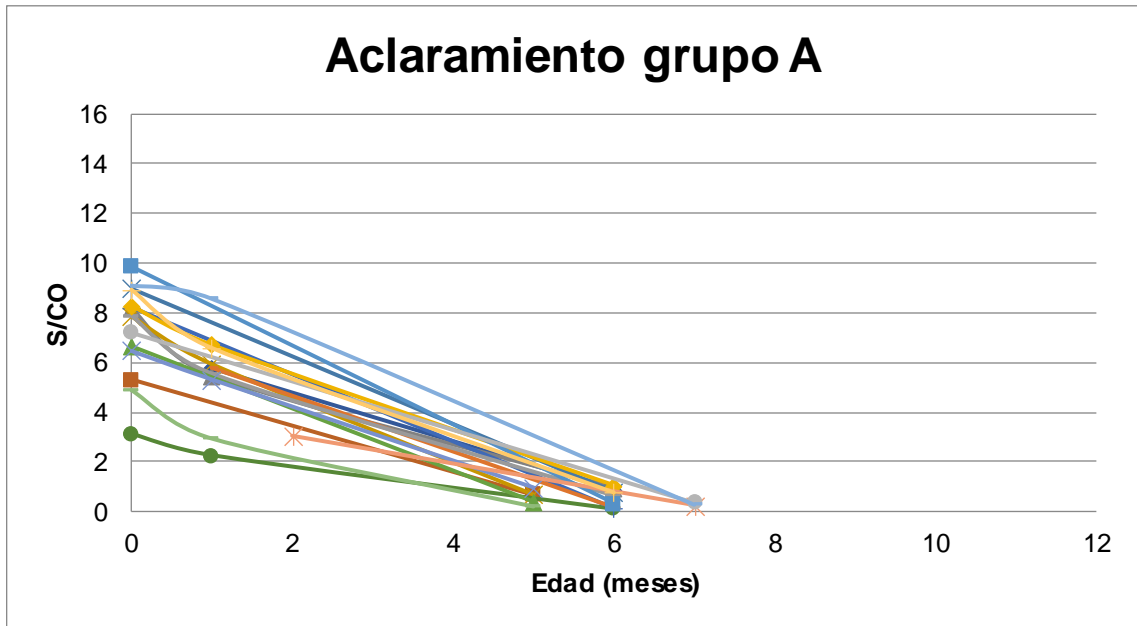


Figura 27. Evolución de los valores de CMIA (S/CO) de los niños del grupo A.

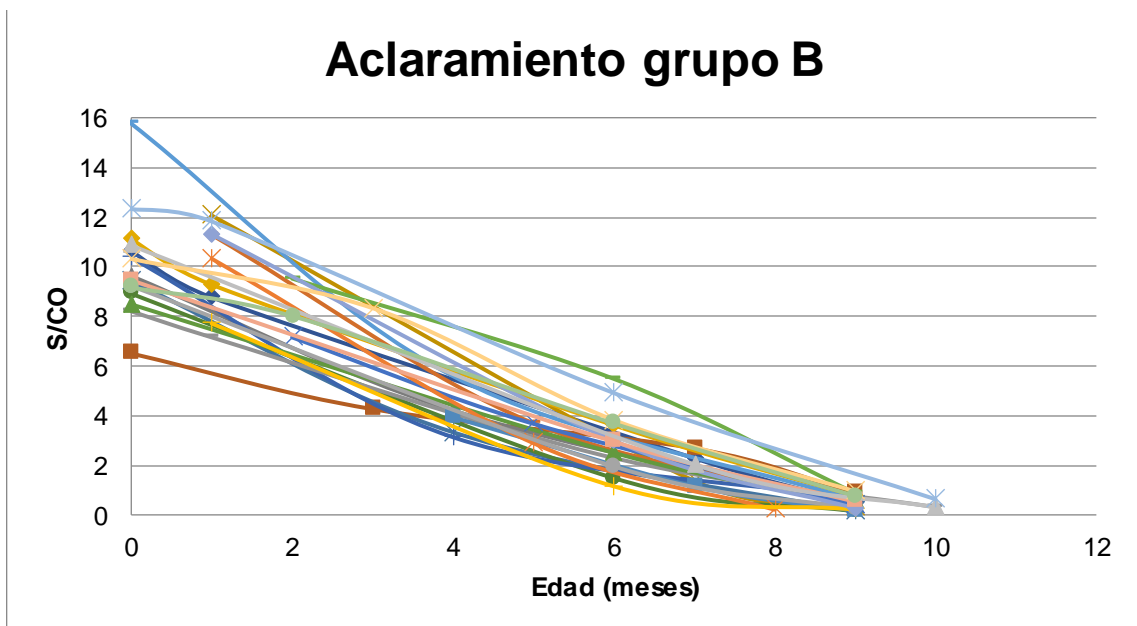


Figura 28. Evolución de los valores de CMIA (S/CO) de los niños del grupo B.

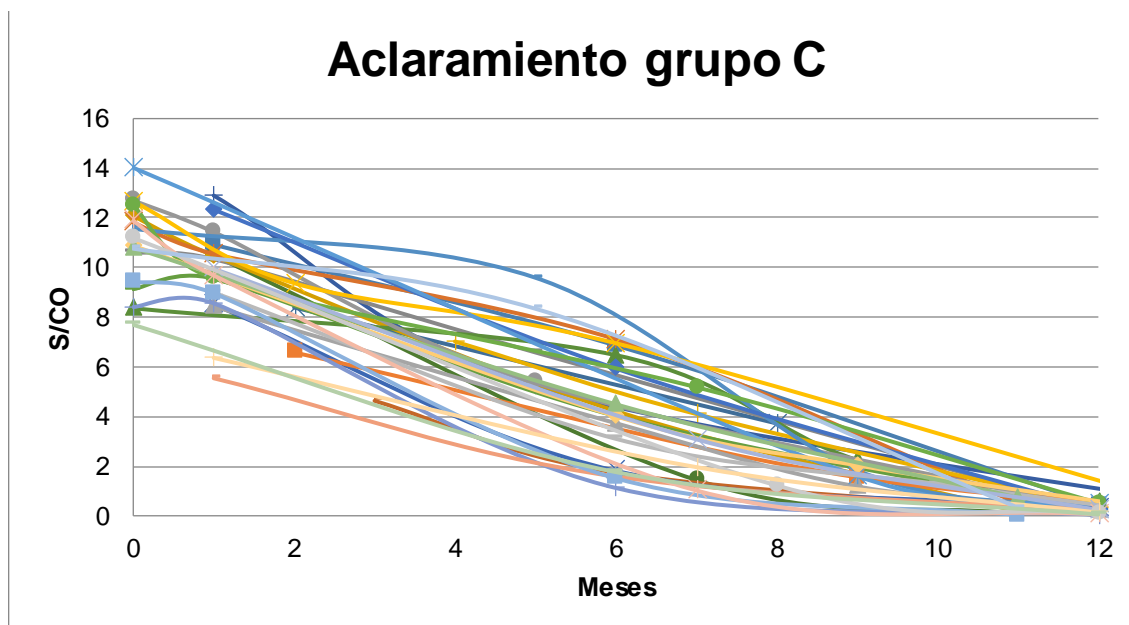


Figura 29. Evolución de los valores de CMIA (S/CO) de los niños del grupo C.

En el caso de los niños del grupo C, la media de los valores de CMIA fue calculada usando datos de 24 niños en el control de 6 meses y de 10 niños en el control de 9 meses debido a la falta de muestras de suero en los demás niños.

Las medias de los valores de CMIA de los 3 grupos se compararon en los diferentes controles (0-2, 6, 9 y 12 meses de vida). Tanto en el control realizado a los 0-2 meses de vida como en el de los 6 meses la media de los valores de CMIA del grupo A fue menor a la de los grupos B y C ($p < 0,05$) mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos B y C ($p = 0,76$). Sin embargo, sí que se encontraron diferencias significativas entre los grupos B y C en el control de los 9 meses ($p < 0,05$).

Nuestros resultados muestran que el 27% (18/66) de los niños ya no tenían anticuerpos maternos medidos mediante CMIA a la edad de 6 meses, el 81% (42/52) a los 9 meses y ninguno de ellos tenía anticuerpos maternos a los 12 meses (74/74). El test de IFI se realizó paralelamente mostrando que el 84% (47/56) de los niños eran negativos a los 6 meses de edad y todos ellos fueron negativos a los 9-12 meses de edad.

4.2 Caso de transmisión congénita

El niño infectado fue diagnosticado con un valor S/CO de 6,74 y un título de IFI superior a 1:160 a los 10 meses de vida (Tabla 37). El niño nació a término y no mostró ninguna manifestación clínica de ECC sintomática. Se le realizaron pruebas complementarias posteriores al diagnóstico (hemograma, pruebas bioquímicas y estudios cardiovasculares) las cuales no mostraron ninguna alteración.

Tabla 37. Valores de CMIA, IFI y resultados de PCR al nacimiento, 1, 6, 10, 14, 18, 30 y 54 meses de vida del caso de Chagas congénito.

Edad (meses)	0	1	6	10	14	18	30	54
CMIA	10,97	9,37	2,44	6,74	7,7	7,11	5,48	4,14
IFI	>1:160	>1:160	1:80	>1:160	1:160	1:160	1:80	1:80
PCR	NEG	NEG	NR	NR	POS	NEG	NEG	NEG

El seguimiento serológico de este niño reveló una disminución mantenida de los anticuerpos desde el nacimiento hasta los 6 meses de vida; posteriormente, se observó una subida inesperada del valor de CMIA y del título de IFI a la edad de 9 meses que continuó en aumento hasta los 12 meses de vida (figura 30).

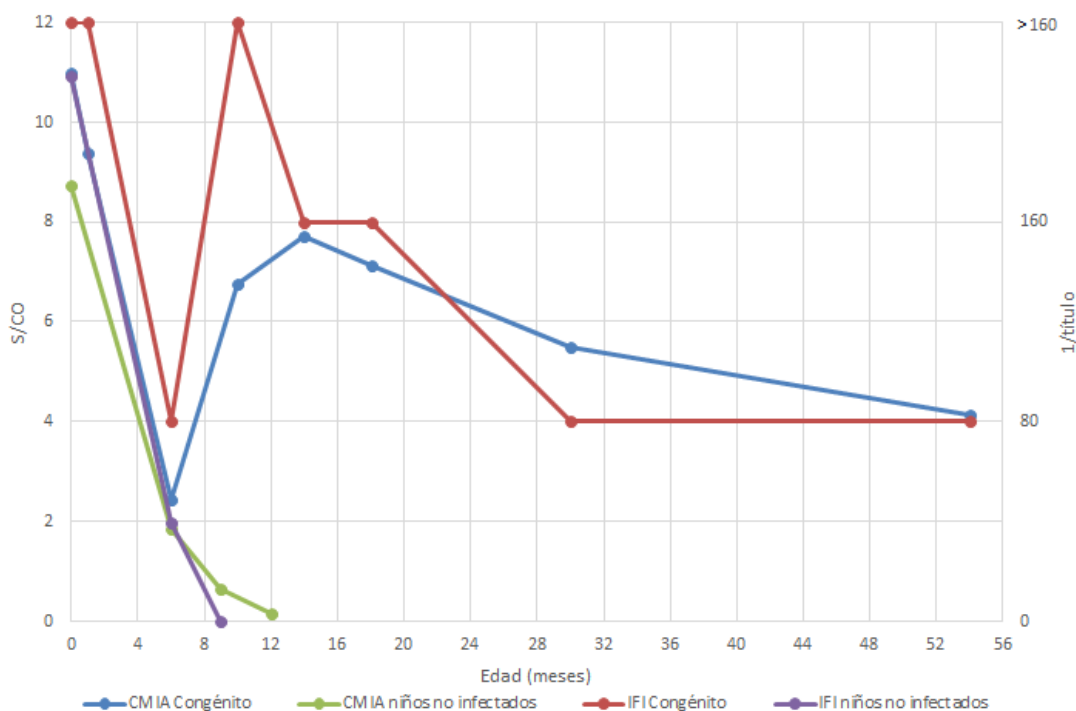


Figura 30. Evolución de los valores de CMIA (S/CO) e IFI (1/título) del niño diagnosticado de ECC y de la media de los niños no infectados. El eje de ordenadas izquierdo corresponde a los valores de CMIA y el derecho a los valores de IFI.

A los 6 meses de edad, no había diferencias entre el niño infectado (S/CO 2,44) y los niños no infectados del grupo B y C [S/CO (\bar{x}) 3,19]. Sin embargo, sí que se observa una diferencia clara entre la media de CMIA de los grupos B y C y el valor de CMIA del niño infectado a los 9 meses [S/CO (\bar{x}) 0,61 y S/CO 6,74 respectivamente].

Después del diagnóstico, el niño fue tratado según las guías clínicas a los 14 meses sin la aparición de efectos secundarios. La PCR al inicio del tratamiento era positiva, negativizando 90 días después del tratamiento. Se continuó con el seguimiento serológico hasta el tercer año postratamiento con unos valores de CMIA de 7,11 al inicio y 4,14 3 años postratamiento y un título de IFI de 1:160 al inicio y 1:80 3 años postratamiento. Actualmente el paciente continúa en seguimiento por la Unidad de Medicina Tropical.

5 Coinfección de pacientes de Chagas con otros parásitos

Desde mayo de 2018 en el servicio de Microbiología y Parasitología se realiza la detección anticuerpos frente *Strongyloides stercoralis*, *Toxocara canis* y *Schistosoma sp.* Durante este periodo (mayo 2018- diciembre 2021), se han realizado un total de 1.071 determinaciones correspondiendo: 535 (49,9%) a *Strongyloides stercoralis*, 332 (30,9%) determinaciones a *Schistosoma sp.* y 204 (19,2%) a *Toxocara canis* (Figura 31).

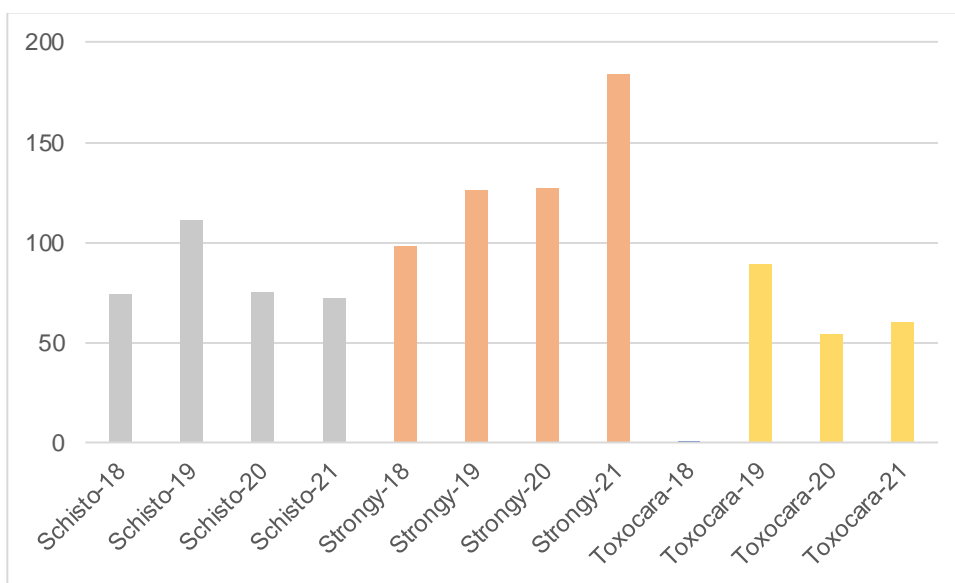


Figura 31. Evolución del número de serologías de *Schistosoma sp.*, *Strongyloides sp.* y *T. canis* realizadas en los años 2018-2021.

Como se puede observar en la gráfica, el parásito más estudiado ha sido *S. stercoralis*, en el cual han aumentado las peticiones un 47% desde su inicio (2018 a 2021). Las serologías de *Schistosoma sp.* se han mantenido estables durante todo el periodo estudiado con un aumento puntual en 2019; por lo que respecta a las determinaciones de anticuerpos frente a *T. canis*, se observa que han sufrido una disminución del 33% desde su implementación en 2019

En cuanto a los resultados de las diferentes serologías, se obtuvo una positividad de 14,5% (78/335) para *S. stercoralis*, de 24,1% (80/332) para *Schistosoma sp.* y de 27,9% (57/204) para *T. canis* (Figura 32).

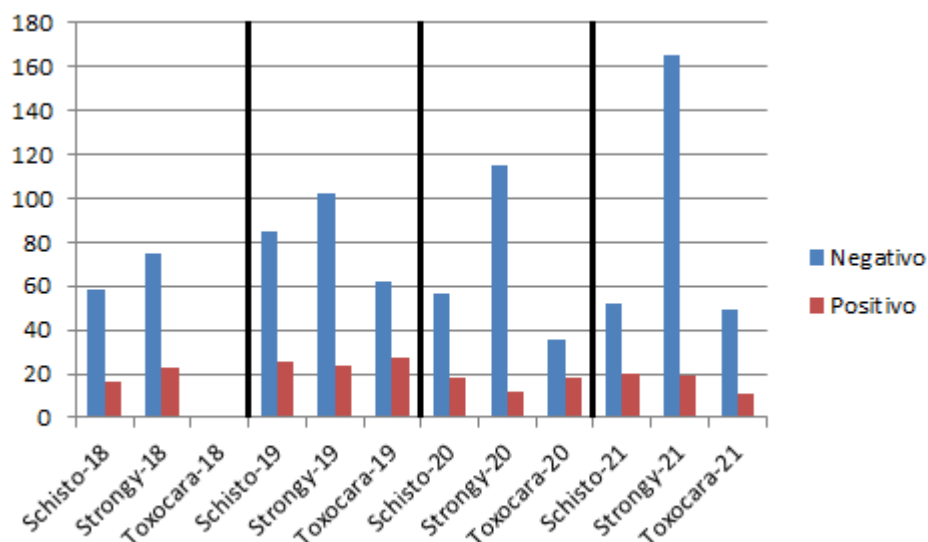


Figura 32. Serologías positivas y negativas para *Schistosoma sp.*, *Strongyloides sp.* y *T. canis* en los años 2018-2021.

Los pacientes en los que se realizaron las determinaciones se clasificaron en 2 grupos atendiendo a los siguientes criterios:

- a. Pacientes con EC crónica (N=542)
- b. Pacientes sin EC con sospecha de parasitosis gastrointestinal (N=119)

En los pacientes con ECC se observó una prevalencia de anticuerpos del 33,3% (37/74) para *Strongyloides sp.*, del 24,4% (21/65) para *Schistosoma sp.* y del 48,5% (32/34) para *T. canis*.

En los pacientes sin EC se observó una prevalencia de anticuerpos del 9,6% (41/383) para *Strongyloides sp.*, del 23,9% (59/187) para *Schistosoma sp.* y del 18,1% (25/113) para *T. canis* (Figura 33).

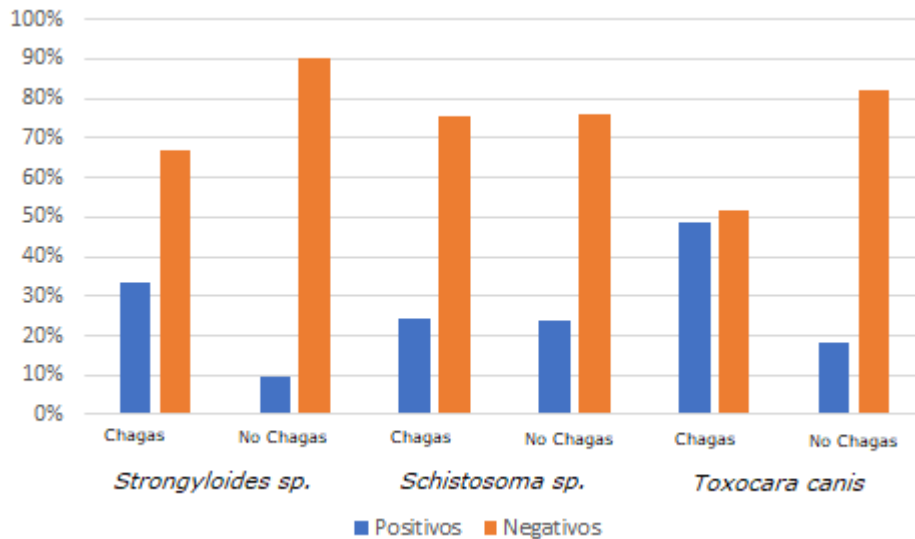


Figura 33. Resultados de las serologías de *Strongyloides sp.*, *Schistosoma sp* y *Toxocara canis* realizadas entre mayo de 2018 y diciembre de 2021 de los pacientes con ECC y de los pacientes sin EC con sospecha de parasitosis gastrointestinal.

Se han encontrado diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre la prevalencia de anticuerpos anti-*S. stercoralis* y anti-*T. canis* entre los pacientes con ECC y los pacientes sin EC con sospecha de parasitosis; sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en la prevalencia de anticuerpos anti-*Schistosoma sp.* entre ambos grupos ($p = 0,93$).

Por último, de los 80 pacientes con serología positiva para *S. mansoni*, 55 fueron estudiados también para *S. stercoralis* y 27 para *T. canis*. Se detectó una parasitación mixta en 23 pacientes: el 25,5% (14/55) fueron positivos para *S. mansoni* y *S. stercoralis* con unos índices medios de $2,59 \pm 1,48$ y $6,25 \pm 3,67$, respectivamente; el 33% (9/27) fueron positivos para *S. mansoni* y *T. canis* con unos índices medios de $2,80 \pm 1,37$ y $2,79 \pm 1,16$, respectivamente.

5.1 Coinfección de *T. cruzi* con *S. stercoralis*

Se realizó un estudio en 254 pacientes con infección por *T. cruzi* en busca de coinfección con *S. stercoralis*. La media de edad de los pacientes fue de 38,1 años (rango: 17-65 años) siendo mujeres el 57% de los pacientes. La estancia media los pacientes en España era de 7,8 años. El 98% (249/254) de los

pacientes eran de origen boliviano, 2 de origen argentino, 2 brasileño y 1 ecuatoriano.

Se procedió a la detección de anticuerpos IgG anti-*S. stercoralis* en los 254 pacientes estudiados, de los cuales 141 (56%) fueron positivos.

Tabla 38. Descripción de los datos demográficos y clínicos de los 254 pacientes del estudio de coinfección de *T. cruzi* y *S. stercoralis*.

Género	
• Hombres	110 (43%)
• Mujeres	144 (57%)
Edad media (años)	38,10 (14-65)
País origen	
• Bolivia	249 (98%)
• Otros (Argentina, Brasil, Ecuador)	5 (2%)
Pacientes tratados Chagas	250 (98,4%)
Media de tiempo en España (años)	7,8 (0,3-18)
• 0-10 años	210 (82,6%)
• > 10 años	44 (17,3%)
Pacientes con eosinofilia (>5%)	179 (70,47%)
• Pacientes con 5-10%	46
• Pacientes con 10-20%	105
• Pacientes con 20-30%	28
Eosinofilia media (%)	13,72%

De los 141 pacientes positivos, el 47% eran mujeres (66/141) y el 53% hombres (75/141). En cuanto a su estancia en España, el 13% llevaban más de 10 años en España (18/141) y el 87% menos de 10 años (123/141).

De los 249 pacientes bolivianos, 113 procedían de Cochabamba, 107 de Santa Cruz, 19 de la Región de Chuquisaca y 10 de otras zonas de Bolivia. Teniendo en cuenta los departamentos del país, la prevalencia fue del 42,5% (48/113) en Cochabamba, 68,2% (73/107) en Santa Cruz, 73,7% (14/19) en Chuquisaca y 50,0% (5/10) en las demás regiones.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de los pacientes que residen en Santa Cruz y los que viven en Cochabamba ($p=0,0001$) y en la prevalencia de los pacientes que viven en Santa Cruz y los que viven en Chuquisaca ($p=0,01$).

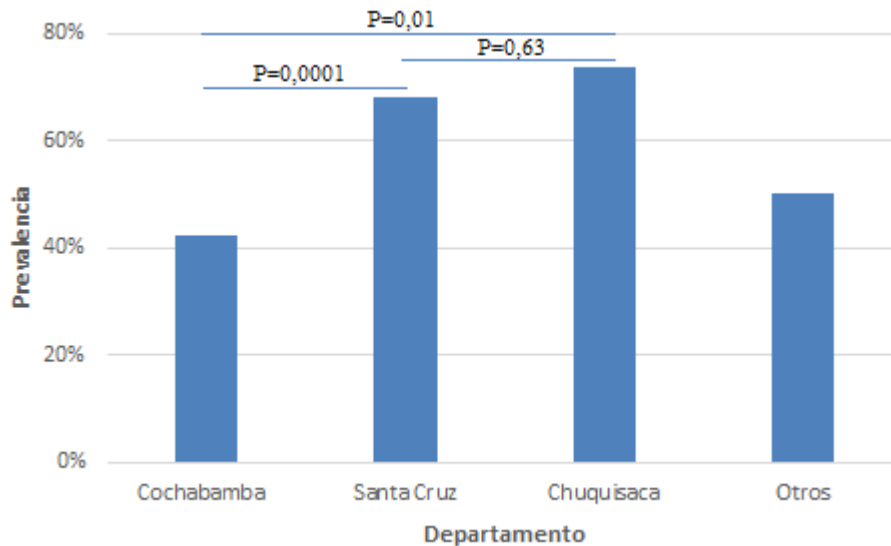


Figura 34. Prevalencia de estrongiloidiasis en pacientes bolivianos según su región de origen.

5.2 Relación entre *S. stercoralis* y presencia de eosinofilia

De los 254 pacientes incluidos en el estudio anterior, el 70% (179/254) presentaban eosinofilia (porcentaje de eosinófilos >5%).

De los 179 pacientes con eosinofilia, 135 (75,4%) tenían anticuerpos IgG anti-*S. stercoralis* con una media de índice de absorbancia de 8,18.

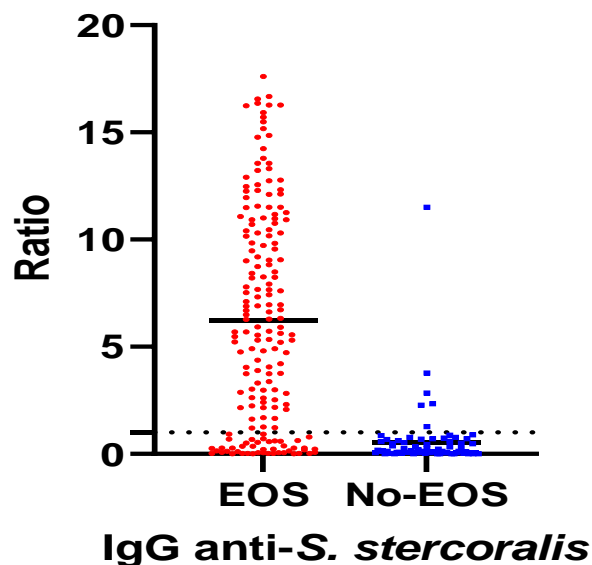


Figura 35. Distribución de los resultados de anticuerpos IgG anti-*S. stercoralis* según la presencia o no de eosinofilia. La línea horizontal dentro de cada grupo indica la media aritmética de los pacientes con eosinofilia y sin eosinofilia (6,24 y 0,54, respectivamente). La línea horizontal discontinua a 1: CO.

Tabla 39. Características demográficas y clínicas de los pacientes del estudio en función de la presencia o no de eosinofilia.

	Con eosinofilia (N=179)	Sin eosinofilia (N=75)
Género		
• Hombres	91 (50,8%)	19 (25,4%)
• Mujeres	88 (49,2%)	56 (74,6%)
Edad (años)	38,46 (14-63)	37,26 (17-65)
Media de tiempo en España (años)	7,67 (1-18)	8,55 (0,3-17)
• 0-5 años	47 (26,3%)	15 (20%)
• 6-10 años	106 (59,2%)	41 (54,7%)
• > 10 años	26 (14,5%)	19 (25,3%)
(\bar{x}) Índice ELISA de los positivos	8,18 (N=135)	2,55 (N=6)

Se realizó una tabla de contingencia para establecer la validez de la presencia de eosinofilia en el diagnóstico de estrongiloidiasis obteniéndose unos valores de sensibilidad del 95,7% y especificidad del 61,1%.

Tabla 40. Tabla de contingencia para el cálculo de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN de la eosinofilia en el diagnóstico de estrongiloidiasis en pacientes con EC.

	Anti-S. <i>stercoralis</i> + (N=141)	Sensibilidad (IC 95%)	Anti-S. <i>stercoralis</i> - (N=113)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
Eosinofilia	135	95,7 (91-98)	44	61,1 (51,8-69,5)	75,4 (68,6-81,1)	92,0 (83,6-96,3)

De los 44 pacientes con eosinofilia y serología negativa para *S. stercoralis* se investigó la posible causa del origen de la eosinofilia:

- Nueve pacientes presentaban otras etiologías infecciosas: 5 pacientes con anticuerpos IgG frente a *T. canis*, 3 pacientes con anticuerpos IgG anti-*Schistosoma* spp. y 1 paciente diagnosticado de tuberculosis.
- Treinta y tres de los pacientes presentaban alguna enfermedad relacionada con el aumento de eosinófilos: 11 eran pacientes con rinitis alérgica, 10 estaban diagnosticados de dermatitis atópica y 2 de asma.
- Dos pacientes habían tenido previamente una infección por *S. stercoralis* que ya había seronegativizado.
- Por último, en 9 de ellos no se pudo encontrar ninguna causa que justificara la presencia de eosinofilia.

Por otro lado, 6 pacientes tuvieron una serología positiva para *S. stercoralis* sin aumento de eosinófilos. Tres de estos pacientes tenían alteraciones de la serie blanca (dos presentaban leucocitosis y uno leucopenia).

5.3 Evaluación de 2 técnicas ELISA comerciales para el diagnóstico y seguimiento de estrogiloidiasis

Se realizó un estudio en 55 pacientes para evaluar la capacidad de detección de anticuerpos IgG anti-*S. stercoralis* de dos técnicas de ELISA: Strongyloides IgG (DRG Instruments GmbH, Alemania) y Anti-Strongyloides ELISA IgG (Euroimmun AG, Alemania).

Se consideró infectado cualquier paciente con serología positiva para *S. stercoralis* por una de las dos técnicas y aumento de eosinófilos o cualquier paciente con serología positiva para *S. stercoralis* por ambas técnicas.

De las 55 muestras que se analizaron, 49 (89,1%) fueron concordantes y 6 (10,9%) fueron discordantes. El coeficiente de concordancia (índice Kappa) entre ambas técnicas fue de 0,8 (muy buena correlación).

Treinta y siete (67,3%) pacientes se consideraron infectados y 18 (32,7%) no infectados según el criterio indicado. Los resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de ambas técnicas se detallan en la tabla 41.

Tabla 41. Resultados de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las técnicas evaluadas.

	Infectados N=37	Sensibilidad (IC 95%)	No Infectados N=18	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
ELISA DRG	34	91,9 (78,7- 98,2)	14	77,8 (54,8-91)	89,5 (75,9- 95,8)	82,4 (59- 93,8)
ELISA EUROIMMUN	37	100 (90,6-100)	17	94,4 (74,2-99)	97,4 (86,5- 99,5)	100 (81,6- 100)

Los 37 pacientes infectados por *S. stercoralis* fueron tratados con ivermectina 200 µg/kg/día durante 2 días y 30 de ellos (positivos por ambas técnicas) acudieron un año después al control postratamiento. En este caso, se evaluó la utilidad de las técnicas ELISA en el seguimiento de pacientes con

infección por *S. stercoralis*. Se realizó el estudio empleando los mismos métodos diagnósticos, considerando como criterio de curación la negativización del ELISA o una disminución del índice de absorbancia en al menos un 60% (ratio del índice postratamiento/pre-tratamiento < 0,6)

Al año de tratamiento 24 pacientes (80%) cumplían criterios de curación por la técnica de DRG y 21 pacientes (70%) por la técnica de Euroimmun.

Hubo 5 pacientes que no cumplieron criterios de curación por ninguna de las dos técnicas (tabla 42) y 5 con resultados discordantes entre ambas técnicas (tabla 43).

Tabla 42. Valores IgG anti-*S. stercoralis* pre-tratamiento y 1 año postratamiento de los pacientes que no seronegativizaron siguiendo el criterio establecido.

Pacientes	ELISA DRG-Pre	ELISA DRG-Post	Ratio DRG	ELISA EIM-Pre	ELISA EIM-Post	Ratio EIM	EOS-Pre (%)	EOS-Post (%)
1	11,51	8,96	0,78	3,78	3,18	0,84	4,2	0,9
2	11,50	7,72	0,67	4,96	3,73	0,75	18,0	1,8
3	7,42	11,36	1,53	8,57	7,79	0,91	21,0	19,0
4	6,69	12,12	1,81	5,7	8,19	1,44	10,0	12,0
5	6,62	4,405	0,67	1,81	1,58	0,87	24,5	2,8

Tabla 43. Valores IgG anti-*S. stercoralis* pre-tratamiento y 1 año postratamiento de los pacientes discordantes.

Pacientes	DRG1	DRG2	Ratio DRG	EIM1	EIM2	Ratio EIM	EOS1 (%)	EOS2 (%)
1	16,27	10,29	0,63	7,65	2,33	0,30	23,5	5
2	14,18	2,88	0,20	2,10	1,31	0,62	14	2
3	10,70	1,12	0,11	6,48	6,07	0,94	13,2	6,6
4	3,74	1,52	0,41	4,96	3,63	0,73	11,3	2,8
5	3,30	1,03	0,31	1,33	1,03	0,77	10	3

Posteriormente, se obtuvo una muestra de suero al segundo año del tratamiento de 4 de los 5 pacientes que no negativizaron serológicamente según el criterio previamente establecido y se analizaron por la técnica de DRG obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 44. Valores al inicio, primer y segundo año de tratamiento de los pacientes mediante la técnica de DRG.

Pacientes	DRG1	DRG2 (1 año)	DRG3 (2 años)	Ratio DRG 1^{er} año	Ratio DRG 2^o año
1	11,51	8,96	0,38	0,78	0,03
2	11,50	7,72	2,27	0,67	0,20
3	7,42	11,36	NM	1,53	NR
4	6,69	12,12	0,44	1,81	0,07
5	6,62	4,405	1,12	0,67	0,17

La media de los índices de la técnica de DRG fue de 8,49 (2,82-16,27) en el control pre-tratamiento y de 2,86 (0,28-12,12) un año postratamiento, encontrándose diferencias significativas entre ellas ($p < 0,001$). En cuanto a la técnica de Euroimmun, la media de los índices fue de 6,39 (1,33-9,1) en el control pre-tratamiento y de 2,44 (0,31-8,19) un año postratamiento, encontrándose también diferencias significativas ($p < 0,001$). Los resultados se detallan en la figura 36.

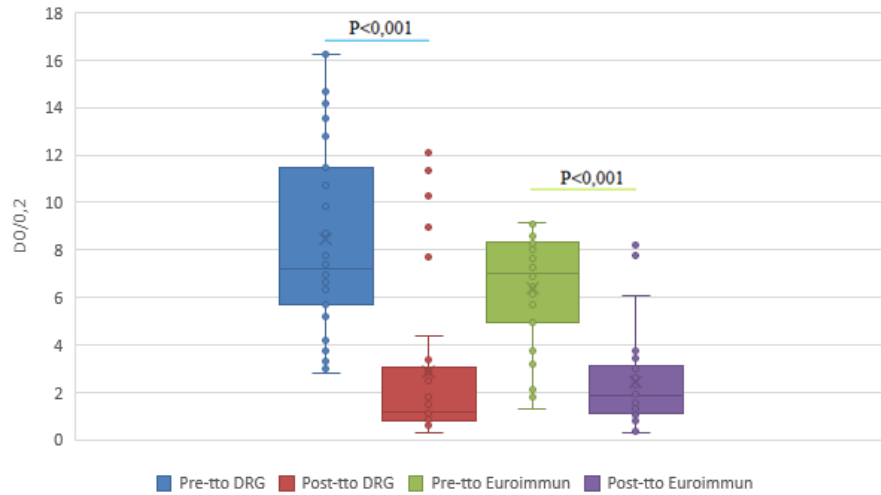


Figura 36. Índices de densidad óptica pre-tratamiento y postratamiento obtenidos por la técnica de DRG y Euroimmun. Se observan diferencias significativas en ambas técnicas ($p < 0,001$). La línea central de cada caja representa la media aritmética de cada grupo y los bigotes su desviación estándar.

En cuanto a la eosinofilia (medida en porcentaje de eosinófilos frente a leucocitos totales), la media disminuyó después del tratamiento de 14,2 % a 3,26% ($p < 0,001$) (Figura 37).

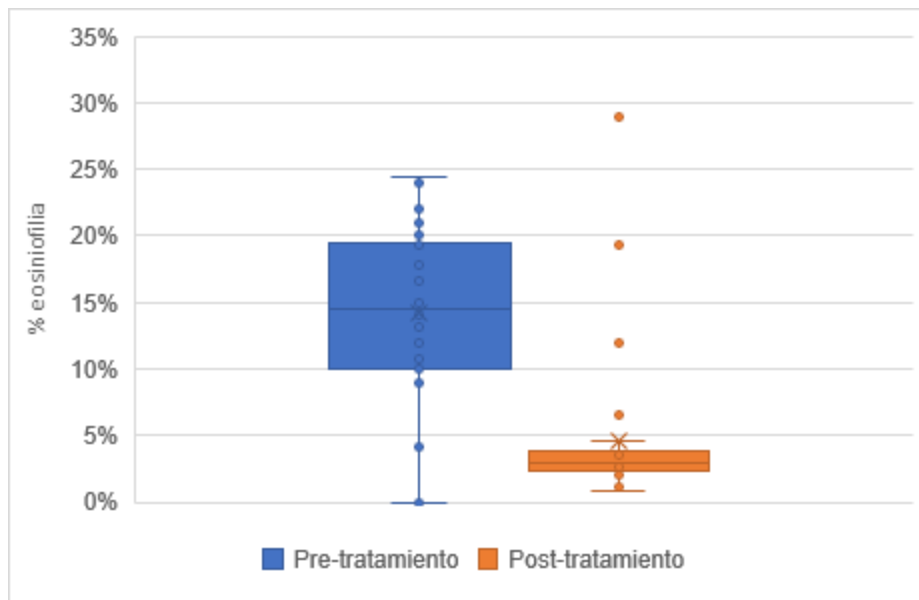


Figura 37. Porcentaje de eosinófilos pretratamiento y postratamiento. La línea central de cada caja representa la media aritmética de cada grupo y los bigotes su desviación estándar.

En la figura se observan 4 puntos que se alejan de la media de eosinofilia en el control postratamiento, los cuales corresponden a pacientes que continuaban con eosinofilia 1 año después del tratamiento con ivermectina. Dos de ellos eran pacientes serológicamente curados y 2 pacientes que no se curaron siguiendo los criterios establecidos.

V. DISCUSIÓN

Los movimientos migratorios de los últimos años de pacientes con EC desde países endémicos, junto con las vías de transmisión no vectoriales han originado la aparición de casos en países y regiones donde antes no existía (Europa, Estados Unidos, Australia...). (Schmunis y Yadon, 2010).

Tradicionalmente, las vías de transmisión transfusional y por trasplante han sido las principales rutas de adquisición de la EC en zona no endémica (G. A. Schmunis, 2007a; G. A. Schmunis, 2007b). Sin embargo, la regulación oficial de las transfusiones sanguíneas y los trasplantes de órganos en Europa y Estados Unidos, han originado que la principal vía de transmisión en estas zonas sea la transmisión vertical, para la cual en este momento no existe regulación.

Aunque en la actualidad no existen trabajos recientes que puedan proporcionar datos fiables de la prevalencia de pacientes con EC en Europa, diversos estudios de la década del 2000 estiman que habría más de 300.000 personas infectadas por *T. cruzi*. (Coura y Viñas, 2010; Schmunis y Zaida, 2009; G. A. Schmunis, 2007b)

A pesar de estas estimaciones, hasta el año 2009 sólo habían sido diagnosticados 4.290 casos en Europa, lo que supondría que entre el 94-96% de los casos estarían aún sin diagnosticar (Lidani *et al.*, 2019). Las principales causas de la escasa detección de pacientes infectados serían la baja o nula experiencia en el diagnóstico y en el manejo de la infección por parte de los profesionales sanitarios, el reducido acceso de las comunidades con más riesgo a los programas de cribado de la enfermedad, así como el retraso en el diagnóstico, ya que la mayoría de pacientes se encuentran en fase crónica asintomática y pueden continuar durante años sin ninguna sintomatología (Rassi *et al.*, 2010).

Debido a los vínculos lingüísticos y culturales que existen entre los países Latinoamericanos y España, nuestro país se sitúa como el país con más inmigrantes de origen Latinoamericano de Europa. Esta población ha ido aumentando desde el año 1998, para disminuir entre los años 2008-2016 y situarse en el 2021 en 1.123.517 personas. De ellas, se estima que más de 50.000 estarían infectadas por *T. cruzi*, de las cuales aproximadamente el 60% serían mujeres en edad fértil (Navarro *et al.*, 2012).

Según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) en el año 2021 en la Región de Murcia vivían 40.901 personas de origen latino, de los que 6.491 eran de nacionalidad boliviana. De los 6.491, el 53,4% son mujeres (3.466) y de estas, 2.762 se encuentran en edad fértil (15-50 años), las cuales podrían transmitir la EC a sus hijos y contribuir al aumento de casos en zona no endémica mediante la transmisión vertical.

Existen estrategias de cribado para el diagnóstico de ECC en algunos países europeos como España, en la que las comunidades de Galicia, Valencia y Cataluña cuentan con protocolos de cribado prenatal para la EC (Requena-Méndez *et al.*, 2014). En Murcia, el cribado de las mujeres latinas embarazadas se encuentra recogido en el Plan Integral de Atención a la Mujer, sin embargo, el manejo de los niños nacidos de madres con EC no se encuentra regulado en la mayoría de países, con el consiguiente riesgo de ECC fuera de zona endémica, la cual alcanza una tasa de transmisión de entre el 5% y el 10% en países no endémicos (Howard *et al.*, 2014; Simón *et al.*, 2019).

1 Implementación de un Programa de Control de Calidad en el diagnóstico serológico de la Enfermedad de Chagas

Tradicionalmente, el diagnóstico de la EC se ha basado en la observación del parásito en sangre (fase aguda) o el uso de 2 técnicas serológicas convencionales de distinto principio antigénico (fase crónica), la cual debía ser confirmada con una tercera técnica serológica si existía discordancia entre las dos primeras (OMS, 2003).

Actualmente, en la mayoría de países no endémicos (Europa y EEUU), la realización del diagnóstico mediante pruebas serológicas se ha automatizado mediante el uso de autoanalizadores; estos equipos utilizan técnicas de gran sensibilidad basadas en la quimioluminiscencia (CLIA) o electroquimioluminiscencia (ECLIA). Esta incorporación ha supuesto un cambio en el algoritmo diagnóstico tradicional, por lo que el flujo de trabajo actual se basa en utilizar una técnica de gran sensibilidad como cribado (CLIA o ECLIA de antígenos recombinantes) seguida de la confirmación de un resultado positivo mediante una segunda técnica serológica convencional para la obtención del diagnóstico de EC.

En este sentido, los procedimientos de control de calidad son necesarios para asegurar la calidad de los resultados obtenidos en los laboratorios. Su principal objetivo es garantizar la relevancia médica de los resultados emitidos por parte del laboratorio, con la finalidad de mejorar la seguridad del paciente basándose en la calidad de los resultados emitidos (Westgard *et al.*, 2010).

Se estima que el 13% de los errores de laboratorio se producen en la fase analítica (Plebani y Carraro, 1997), por lo que es de vital importancia asegurarse que los resultados que se obtienen en el laboratorio cumplan con los correctos estándares de calidad.

Las recomendaciones nacionales e internacionales indican que los sistemas de gestión de la calidad deben adoptar al menos 2 tipos de controles: controles de calidad internos y controles de calidad externos (PAHO, 1994; WHO, 2002)

La implementación de un **control positivo de calidad interno** requiere la utilización diaria de un suero de control que debe cumplir las siguientes características según el estándar ISO 15189-2012:

- El control debe ser lo más parecido posible a las muestras de los pacientes.
- Una revisión de los resultados de acuerdo con la estabilidad del método y el riesgo de impacto sobre la atención al paciente en caso de obtener un resultado erróneo.
- La reactividad del control debe ser cercana al nivel clínico de decisión.

En nuestro trabajo, la media resultante del pool de sueros que empleamos (Pool 1) (S/CO:3,34) se encuentra dentro del rango de los valores recomendados (S/CO:2-4,5) para la monitorización de las determinaciones diarias que se realizan en nuestro laboratorio (Saez-Alquezar *et al.*, 2015). Además, se puede observar en la figura 17 cómo los datos se sitúan aleatoriamente por encima y por debajo del valor medio de los resultados, mostrando que no existe una tendencia determinada que se desvíe de la media.

La aplicación de las reglas de Westgard al gráfico de Levey-Jennings indica que nuestro ensayo de CMIA para el diagnóstico de EC carece de errores aleatorios y/o sistemáticos. Sólo existen 2 determinaciones que se desvían 1SD de la media y no existe ninguna tendencia en los resultados ni por encima ni por debajo de la media obtenida.

El uso del gráfico de Levey-Jennings para el análisis de los resultados obtenidos facilita el estudio diario del comportamiento del ensayo dentro de los límites de decisión, ya que el gráfico proporciona evidencia de cualquier desviación de las expectativas demostrando tendencias (errores sistemáticos) y/o cualquier dispersión en los resultados (errores aleatorios) (Levey y Jennings, 1950).

Además, el uso de las reglas de Westgard nos permite estudiar mejor las variaciones diarias en los resultados (Westgard *et al.*, 1981), donde las 4 reglas de alerta (Reglas 1, 3, 5 y 6), facilitan la identificación de tendencias que pueden ser corregidas antes de validar los resultados.

En cuanto al coeficiente de variación obtenido (CV: 3,48%), se encuentra dentro de los niveles aceptables para la técnica de CMIA al situarse por debajo del 5 % (Praast *et al.*, 2011), lo que refleja la gran reproducibilidad y robustez de la técnica.

Aunque el ensayo utilizado posee controles positivos proporcionados por el fabricante que se analizan diariamente, es recomendable el uso de controles internos independientes a los suministrados por la casa comercial para evitar resultados erróneos en lotes defectuosos.

En cuanto al **control negativo de calidad interno**, todas las determinaciones realizadas fueron negativas y se encontraron en el rango de valores recomendado para los controles negativos (S/CO<0,8) (Saez-Alquezar *et al.*, 2015).

Como se observa en la tabla 12, todas las determinaciones se encuentran en torno a la media obtenida (S/CO: 0,3). En el control interno negativo, las reglas de Westgard no se utilizan para analizar el desempeño diario, ya que por debajo

del valor del punto de corte la técnica no es lineal; lo único importante es verificar la consistencia de los resultados negativos en torno a la media obtenida.

Por tanto, podemos observar que tanto el control de calidad positivo como el negativo se encuentran en los rangos recomendados y evidencian la robustez y ausencia de errores sistemáticos o aleatorios de nuestra técnica de CMIA para el diagnóstico de EC.

Si bien la implementación de controles de calidad internos nos ayuda a detectar el componente de imprecisión en nuestro laboratorio, no reflejan la exactitud de los resultados, ya que en la práctica clínica diaria las muestras se analizan una única vez. Es por ello necesario implementar asimismo un **control de calidad externo** con el fin de poder verificar que el laboratorio produce resultados conforme las expectativas de calidad necesarias para el cuidado del paciente (Miller *et al.*, 2011).

Los controles de calidad externos se componen de un conjunto de muestras sin identificar (positivas y negativas) que se entregan a los laboratorios para procesar como si se tratara de muestras de pacientes.

Para la buena implementación del control de calidad externo, las instrucciones para la reconstitución de las muestras recibidas así como los intervalos entre determinaciones y la emisión de los resultados a los diferentes organismos se siguieron de manera literal (Fleury *et al.*, 2017).

Además, es de vital importancia que el procesamiento de las muestras se realice conforme a los procedimientos habituales del laboratorio con el fin de detectar los errores que estén presentes en la actividad diaria del mismo (Sáez-Alquézar *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en los controles externos del PNCQ muestran que la técnica más sensible para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* es la CMIA, ya que es la técnica capaz de detectarlos en las mayores diluciones, hasta 1/64 en 2019 y hasta la dilución 1/16 en 2021.

El ensayo de IFI muestra una menor sensibilidad (dilución 1/16 en el año 2019 y 2021), siendo la técnica con más fluctuaciones en los resultados entre diluciones y días del ensayo. Este hecho puede deberse a la subjetividad y

complejidad de la técnica de IFI con respecto a la CMIA, una técnica más automatizada y con menor factor de error humano en su lectura e interpretación (Flores-Chavez *et al.*, 2018; Iborra-Bendicho *et al.*, 2012).

En cuanto a los resultados obtenidos por ICT, la sensibilidad fue la misma que para la CMIA en el año 2019. Aunque en los controles del año 2021 tuvo un comportamiento más errático y su sensibilidad disminuyó hasta la dilución 1/4 en una de las determinaciones del PNCQ1. Sin embargo, consideramos que constituye una gran herramienta de diagnóstico para su utilización en campañas de cribado o en zonas rurales donde el envío de muestras a un centro de referencia sea complicado.

Por último, los resultados obtenidos por las 3 técnicas en el PNCQ2 del año 2019 y 2021 muestran la excelente especificidad que poseen para la detección de anticuerpos de *T. cruzi*, aunque desconocemos si los sueros proporcionados correspondían a pacientes con otras infecciones parasitarias como las producidas por *T. brucei*, *T. rangeli* o *Leishmania sp.*, las cuales han sido ampliamente estudiadas por provocar resultados falsos positivos en el diagnóstico de EC (de Moraes *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2001a).

Dado que los estándares de la OMS para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* poseen una concentración de 500 mIU/ml una vez reconstituidos (Flores-Chavez *et al.*, 2018), su relación con las diferentes diluciones realizadas en este trabajo son las siguientes:

- El ensayo de CMIA detectó anticuerpos de *T. cruzi* a una dilución de 1:64 en ambos estándares, lo que corresponderían a un límite de sensibilidad de 7,8 mIU/ml, siendo ésta la técnica más sensible de las 3 estudiadas, lo que se encuentra en concordancia con estudios previamente realizados por otros grupos de investigación (Abrás *et al.*, 2017; Flores-Chavez *et al.*, 2018).
- La técnica de IFI por otro lado, fue positiva hasta la dilución 1/16 en el estándar OMS 09/188 y a las diluciones 1/16 y 1/32 en el estándar OMS 09/186, lo que situaría su límite de sensibilidad en

31,3 y 15,6 mIU/ml, lo que nos hace considerarla como una técnica menos sensible que la CMIA.

- En cuanto a la ICT, debido al bajo volumen con el que se deben reconstituir los estándares de la OMS (0,5mL), no se pudo disponer de muestra suficiente para la realización de la técnica.

Dado que los estándares de la OMS están compuestos tanto de anticuerpos de pacientes infectados con DTUs TcI y TcII, nuestro estudio muestra que el rendimiento del ensayo ARCHITECT Chagas® (Abbot, Alemania) y el ensayo CHAGAS IFI IgG+IgM® (Vircell, España) serían adecuados para la detección de estas dos DTUs, y por consiguiente, del estudio de la EC en pacientes procedentes de Brasil, Chile, México (países de los que se obtuvieron los estándares), así como de otras zonas en las que las infecciones sean producidas por estas dos DTUs como es el caso del sur de Bolivia, norte de Argentina o Paraguay (Zingales *et al.*, 2012).

En esta línea, otros estudios han demostrado que la diferencia en la fuerza relativa de cada test en los diferentes estándares estudiados (OMS 09/166 y OMS 09/188) añade una mayor dificultad a la hora de desarrollar un gold estándar para la detección de anticuerpos de *T. cruzi*, debido a la diversidad en la distribución geográfica de los linajes del parásito y su correspondiente respuesta inmune (Sáez-Alquezar *et al.*, 2020).

Estos datos, junto con los resultados obtenidos en los controles internos de calidad, nos permitirían establecer un algoritmo diagnóstico en el que la técnica de CMIA se utilizara como técnica de cribado debido a su alta sensibilidad, y posteriormente realizar otra técnica serológica confirmatoria en los pacientes positivos. Esto disminuiría los costes del diagnóstico de la EC y mejoraría el flujo de trabajo, como ya ha sido propuesto recientemente por el grupo técnico en “Prevención y Control de la Trasmisión Congénita y el Manejo de los Casos de Infección Congénita y Pediátrica por *T. cruzi*” (Carlier *et al.*, 2019).

Por último, cabe mencionar que además de la implementación de controles de calidad, tanto internos como externos, para asegurar la calidad de los resultados obtenidos en los laboratorios en el diagnóstico de la EC, esta práctica debería extenderse a las demás determinaciones que realice el laboratorio.

En este sentido, existe una herramienta reconocida internacionalmente para evaluar y controlar los resultados que se obtienen en los laboratorios: la acreditación. En España, la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) es la que aporta credibilidad y confianza en la evaluación y control de las técnicas y procesos que se realizan en el laboratorio. Se trata de una evaluación independiente, global y rigurosa la cual se basa en normas de carácter nacional y es reconocida internacionalmente.

Más concretamente la norma internacional que se debe aplicar en los Laboratorios Clínicos para gestionar la calidad y evaluar la competencia técnica mediante el cumplimiento de sus requisitos es la ISO 15189:2012.

Esta norma recoge la documentación necesaria para gestionar la calidad del laboratorio, los servicios de asesoramiento disponibles y las acciones correctivas y preventivas necesarias para garantizar la mejora continua en la emisión de resultados; así como los procesos de evaluación y de auditoría interna necesarios para demostrar que todos los procesos (preanalíticos, analíticos y postanalíticos) se cumplen de acuerdo a las necesidades y requisitos de los usuarios garantizando la conformidad con el sistema de gestión de calidad.

Dado que los servicios del laboratorio clínico son esenciales para el manejo del paciente, se debe perseguir cualquier esfuerzo para mejorar los estándares de calidad con los que se trabaja, así como aumentar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

2 Relación entre los títulos de IFI y los valores de CMIA para el seguimiento de la Enfermedad de Chagas

Tradicionalmente, el diagnóstico y el seguimiento de la EC se ha basado en el uso de técnicas serológicas como la HA, IFI y ELISA convencionales (de

parásito crudo o de extractos purificados del mismo). Éstos tienen como principal inconveniente presentar reactividad cruzada con otros tripanosomátidos como *T. rangeli* y *Leishmania sp.*, disminuyendo su especificidad (de Moraes *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2001b).

Dado que no existe un gold estándar para el diagnóstico de la EC en pacientes crónicos, existen en el mercado multitud de test con diferentes sensibilidades y especificidades (Flores-Chávez *et al.*, 2010), lo que dificulta la comparación de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos de investigación así como la estandarización de un único test diagnóstico.

Recientemente, se han desarrollado pruebas no convencionales (basadas en antígenos recombinantes, purificados o quiméricos) que poseen una mayor especificidad, lo que los convierte en una gran herramienta para el diagnóstico de la EC crónica (Caballero *et al.*, 2007b; Flores-Chavez *et al.*, 2018).

Además, la aparición de plataformas automatizadas basadas en CLIA o ECLIA nos permite procesar una mayor cantidad de muestras diariamente, por lo que son las técnicas ideales para el empleo como técnicas de rutina en centros de referencia con gran volumen de muestras.

Varios estudios han demostrado que la técnica de CMIA posee una gran sensibilidad y especificidad (ambas superiores al 90%) (Chang *et al.*, 2006; Iborra-Bendicho *et al.*, 2012), situándola como una gran herramienta para el diagnóstico de la EC.

Por otro lado, debido a su gran sensibilidad, se ha observado que la técnica de CMIA detecta anticuerpos anti-*T. cruzi* durante más tiempo que los ELISA convencionales o la IFI (Abrás *et al.*, 2017; Gil-Gallardo *et al.*, 2021), lo que podría dificultar su utilidad como técnica de seguimiento en los pacientes tratados.

Los estudios de seguimiento realizados con técnicas convencionales en pacientes con EC tratados en la fase crónica de la enfermedad (nifurtimox o benznidazol) revelan una disminución de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* tras el tratamiento. Esta disminución puede prolongarse durante años o incluso décadas hasta la completa seronegativización (Ciapponi *et al.*, 2020; Murcia *et*

al., 2010; Sguassero *et al.*, 2018), por lo que es difícil evidenciarla en los controles postratamiento. No obstante, sigue siendo la única manera de cerciorarse de la completa eliminación del parásito en el organismo según la OMS y la PAHO (OMS, 2002; PAHO, 2019).

Una situación diferente presentan los pacientes con infección aguda (como ocurre en la ECC), donde la administración del tratamiento antes del primer año produce una bajada de anticuerpos postratamiento más rápida que en los pacientes con EC crónica; en estos casos el seguimiento serológico sí que evidencia la total eliminación de anticuerpos anti-*T. cruzi* y la consiguiente cura parasitológica (Moscatelli *et al.*, 2019).

Debido a estos problemas, diversos grupos están trabajando en la evaluación de diferentes moléculas que puedan ser empleadas como biomarcadores, y nos permitan evidenciar la eficacia del tratamiento a corto plazo. En esta línea, existen algunos péptidos prometedores como el KMP11, PFR2 o el HSP70 que presentan un descenso estadísticamente significativo en el nivel de anticuerpos, a los seis y nueve meses tras el tratamiento con benznidazol (Fernández-Villegas *et al.*, 2011)

En nuestro laboratorio, la técnica empleada para el seguimiento postratamiento y valoración del descenso del título de anticuerpos es una IFI (CHAGAS IFI IgG+IgM®; Vircell, España); sin embargo, es una técnica laboriosa de realizar, que requiere equipamiento específico (microscopio de fluorescencia) y tiene una interpretación subjetiva que depende del observador.

Por el contrario, la técnica de CMIA es una técnica automatizada semicuantitativa que nos permite analizar un mayor número de muestras y cuya interpretación es objetiva, por lo que sería de gran ayuda obtener un factor de conversión que relacionara el valor obtenido de S/CO en CMIA con el título de anticuerpos obtenido mediante IFI.

En nuestro estudio observamos que la técnica de CMIA no es lineal en su totalidad, lo cual dificulta el poder establecer una relación directa entre ambas técnicas. Encontramos una primera fase lineal en los valores positivos de CMIA comprendidos entre S/CO: 1-4; posteriormente existe una segunda fase en los valores de S/CO>4 que no sigue una cinética lineal. A partir de valores de S/CO

>4, el aumento de anticuerpos en la muestra se corresponde con un menor aumento del valor de S/CO, por lo que en los controles postratamiento, el porcentaje de bajada de anticuerpos no se correlaciona linealmente con la disminución del valor de CMIA.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos mediante IFI, observamos que en este caso cualquier disminución en la cantidad de anticuerpos en el suero de los pacientes va acompañada de una disminución proporcional en el título de anticuerpos, ya que se trata de una técnica lineal cuantitativa. La relación entre la dilución del Pool de sueros y el título de anticuerpos medidos mediante IFI es directamente proporcional.

Dado que los valores obtenidos por la técnica de CMIA no son directamente proporcionales al título de anticuerpos presente en la muestra, no podemos establecer una correlación directa entre la disminución del valor de CMIA y la disminución de anticuerpos en las muestras.

Podemos observar que cuando se diluyen los Pools de anticuerpos a la mitad en los valores altos de CMIA (S/CO 7,65-11,54), obtenemos una disminución en el valor de CMIA entre el 3 y el 19% en vez de una disminución del 50%. No obstante, conforme nos acercamos al punto de corte de la técnica, esta disminución va aumentando hasta situarse en torno al 41-47%. Es decir, como habíamos observado con anterioridad, en valores de CMIA >4 la técnica pierde su linealidad, pero en los valores de S/CO entre 1-4, la técnica tiende a la linealidad, por lo que podríamos diluir las muestras a analizar hasta encontramos en el rango lineal de la técnica para poder calcular con mayor precisión la disminución de anticuerpos en los pacientes tratados.

Además, si comparamos la media de S/CO y la DE obtenida para cada título de anticuerpos medidos por IFI, podemos establecer un rango de valores de CMIA (\bar{X} S/CO \pm DE) equivalentes a la técnica de IFI.

Tabla 45. Equivalencia entre títulos de anticuerpos medidos mediante IFI y rangos de valores de CMIA (\bar{X} S/CO \pm DE).

IFI	Rango S/CO
1/2560	12,92-10,69
1/1280	11,46-10,14
1/640	9,36-8,64
1/320	7,97-7,06
1/160	6,14-5,66
1/40	4,25-2,62
1/20	2,60-1,64

Como podemos observar, a títulos altos (1:2560 y 1:1280), los rangos de CMIA se solapan, sin embargo, a partir de títulos de 1:640, cada rango de valores de CMIA corresponde a un título de anticuerpos determinado.

Por tanto, para cada resultado de CMIA obtenemos un valor aproximado en títulos de anticuerpos, con lo que se puede establecer una conversión aproximada y utilizar la técnica de CMIA para el seguimiento de la disminución de anticuerpos en pacientes tratados.

3 Evaluación de diferentes técnicas de biología molecular para el diagnóstico de Enfermedad de Chagas

La utilización de las técnicas de biología molecular (PCR) para el diagnóstico de EC comenzó en la década de los noventa con la aparición de varios protocolos de PCR “*in house*” desarrollados para su uso en investigación (Moser *et al.*, 1989; Wincker *et al.*, 1994).

Si bien la parasitemia disminuye conforme progresa la enfermedad hacia la fase crónica, donde esta es baja e intermitente (Alonso-Padilla *et al.*, 2017), el uso de la PCR para la detección de ADN de *T. cruzi* es de gran utilidad en el diagnóstico de infección aguda y en el seguimiento de los pacientes que tienen PCR positiva antes de comenzar el tratamiento (Bua *et al.*, 2013; Murcia *et al.*, 2010; Simón *et al.*, 2019), ya que evidencia la eliminación del parásito en sangre.

La existencia de diferentes dianas moleculares (ADNsat, ADNk, Miniexón...) y diferentes protocolos de PCR han impedido su estandarización, por lo que en la actualidad no existe un único protocolo para su uso en el diagnóstico de la EC.

Como hemos comentado con anterioridad, se han desarrollado numerosas combinaciones de dianas moleculares, sets de primers y sondas, métodos de extracción de ADN y plataformas de amplificación con diferentes grados de sensibilidad, especificidad y precisión, la cual depende en parte de los grupos epidemiológicos y el tipo y el volumen de las muestras utilizadas, entre otros factores (Diez *et al.*, 2007; Murcia *et al.*, 2010; Piron *et al.*, 2007; Russomando *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003).

Para identificar los mejores protocolos disponibles, el Programa Especial para la Investigación y Entrenamiento en Enfermedades Tropicales (TDR-WHO) financió un estudio internacional comparativo para la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica. Después de analizar la sensibilidad y especificidad de 48 protocolos diferentes, se seleccionaron 4 métodos para la estandarización y la validación intra-laboratorio, los cuales estaban basados en las secuencias del ADNk o el ADNsat.

En nuestro hospital hemos trabajado desde 2010 con el protocolo elaborado por Wincker y colaboradores (Wincker *et al.*, 1994) modificado por Murcia y colaboradores (Murcia *et al.*, 2010) para detectar el ADNk de *T. cruzi* en muestras de pacientes con EC. Aunque posee una buena sensibilidad y especificidad, es una técnica lenta y tediosa que no hace posible la realización de las PCRs en un único día, lo que ralentiza la obtención de resultados y la toma de decisiones.

En este trabajo, hemos realizado una comparativa entre una PCR a tiempo final [PCR “*in house*” (ADNk)] y dos PCRs a tiempo real [PCR-Alt (ADNk) y PCR-Pro (ADNsat)] con el fin de establecer el límite de detección (LOD) de cada una de ellas y poder compararlas entre sí.

Como se puede observar en los resultados, la PCR-Alt y la PCR “*in house*” poseen el mismo LOD₉₅ (1,9 copias/ml), mientras que la PCR-Pro posee un LOD₉₅ menor (19 copias/ml).

Estos resultados concuerdan con trabajos previamente realizados por otros grupos, los cuales obtienen una mayor sensibilidad en las PCR cuya diana molecular es el ADNk frente al ADNsat (0,9 parásitos/ml y 1,53 parásitos/ml, respectivamente) (Ramírez *et al.*, 2015).

La muestra utilizada para realizar el cálculo del LOD es un control comercial de ADN de la cepa Y de *T. cruzi*, la cual pertenece a la DTU TcIIb, una de las DTUs con más copias de ADNsat junto con TcIIc/d/e, por lo que es de esperar que el desempeño de la PCR-Pro en cepas con menor número de copias de ADNsat como TcI y TcIIa (de 5 a 10 veces menos copias) sea inferior (Duffy *et al.*, 2009; Hailu *et al.*, 2022).

Dado que carecemos de un *gold standard* para la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre, hemos utilizado la PCR “*in house*” como técnica de referencia, ya que es con la que más experiencia tenemos y posee una gran sensibilidad y especificidad (Murcia *et al.*, 2010; Wincker *et al.*, 1994).

Se han seleccionado muestras de pacientes con EC crónica, embarazadas con EC y sus recién nacidos para poder obtener una muestra representativa de todas las situaciones clínicas en las que esta técnica es útil; sin embargo, no nos ha sido posible obtener muestras de pacientes adultos con EC aguda, ya que en nuestro país carecemos del vector y los casos que diagnosticamos en adultos son pacientes que llevan varios años viviendo en España, y por tanto se encuentran ya en la fase crónica.

Puesto que todos los pacientes del estudio proceden de Bolivia, es de suponer que la DTU más representada en nuestra población de estudio es la TcV, ya que es la responsable del 50% de los casos de EC en Bolivia (Zingales y Bartholomeu, 2022)

Como podemos observar, la sensibilidad obtenida por la PCR-Alt no es alta (55,5%) con respecto a los demás protocolos. Si bien en el apartado anterior su LOD era el mismo que el de la PCR “*in house*”, e incluso era inferior al LOD de la PCR-Pro, en nuestro estudio, su desempeño en muestras clínicas no es el esperado.

Esto ha sido descrito por otros autores, los cuales han observado una importante reducción de la sensibilidad analítica de las técnicas de PCR cuando se comparan los resultados de PCRs realizadas con ADN de parásitos purificado y muestras de sangre con parásitos, sugiriendo que la purificación de ADN en las muestras es crucial para el rendimiento de las PCRs (Duffy *et al.*, 2013; Schijman *et al.*, 2011). Sin embargo, las 3 PCRs de nuestro estudio han sido evaluadas utilizando el mismo protocolo de extracción (Ver material y métodos apartado 2.4.1), por lo que no podemos explicar la baja sensibilidad de la PCR-Alt por este motivo.

Además, todas las técnicas de RT-PCR incluyen un control interno, el cual amplificó en todas las muestras, por lo que podemos descartar el proceso de extracción de la muestra o la presencia de inhibidores de la PCR como causantes de la baja sensibilidad de la PCR-Alt.

Por tanto, la diferencia de sensibilidad de la PCR-Alt podría deberse a que la región del kinetoplasto que amplifica esté menos conservada y mute con más facilidad, impidiendo así que se unan los cebadores a la secuencia diana.

Por último, aunque se ha demostrado que la sensibilidad de las PCRs que amplifican el ADN_{sat} es más errática que la sensibilidad de las PCRs que amplifican el ADN_k debido a la diferencia en copias de ADN_{sat} que existe entre distintas DTUs (Duffy *et al.*, 2009), las PCR dirigidas contra el ADN_k son más propensas a obtener falsos positivos en zona endémica, donde la co-existencia de *T. rangeli* (el cual posee la misma región conservada en el ADN_k que *T. cruzi*) en el entorno hacen que las PCRs que amplifican ADN_{sat} sean una mejor opción (Saldaña *et al.*, 2005).

Aunque las técnicas parasitológicas siguen siendo el *gold standard* en el diagnóstico de ECC, la falta de personal entrenado, la necesidad de procesar la muestra en un corto espacio de tiempo (<24 horas), así como la falta de controles de calidad hacen que en los países no endémicos las técnicas moleculares como la PCR sea una muy buena alternativa para realizar una detección temprana de la ECC (Carlier *et al.*, 2019).

Recientemente, la aparición de diversas PCR comerciales ha permitido la inclusión de la biología molecular en el algoritmo diagnóstico de la ECC en

muchos hospitales (Abrás *et al.*, 2017; Simón *et al.*, 2019), sobre todo en países no endémicos, donde la reactividad cruzada con *T. rangeli* no es un problema.

Dado que el embarazo produce un estado de inmunosupresión en las embarazadas y que los recién nacidos aún no tienen maduro su sistema inmune, la carga parasitaria en la sangre de estos pacientes es mayor que en la de pacientes inmunocompetentes con EC crónica (Ceballos-Pomares *et al.*, 2017).

Sin embargo, los resultados no muestran diferencias significativas en el desempeño de las técnicas moleculares en cuanto a sensibilidad, especificidad, VPP, VPN e índice Kappa con respecto a la cohorte general. Esto puede deberse a que el 78% (71/91) de las muestras pertenecen a madres con EC o a sus hijos.

No obstante, puesto que la sensibilidad de las técnicas parasitológicas tradicionales (microhematocrito, técnica de Strout) se sitúa en torno a 1 parásito/ml en observadores experimentados (Schijman *et al.*, 2022), los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que las 3 técnicas son más sensibles que los métodos tradicionales, por lo que serían de gran utilidad en el diagnóstico de ECC en países no endémicos.

4 Utilidad de la Quimioluminiscencia de micropartículas en el diagnóstico de Chagas congénito

Tradicionalmente, el diagnóstico serológico de la ECC se ha llevado a cabo utilizando 2 (ELISA, HA o IFI), considerando a un niño nacido de madre con EC positivo si ambos ensayos eran positivos a los 10 meses de edad o posteriormente (Torrice *et al.*, 2004). Actualmente, todavía es necesario realizar estos 2 ensayos para diagnosticar la EC debido a la reactividad cruzada que poseen estas técnicas con otros parásitos y a la ausencia de una prueba con una sensibilidad diagnóstica óptima.

Sin embargo, se han desarrollado recientemente ensayos serológicos completamente automatizados con mayor sensibilidad y rendimiento que los tradicionales (Flores-Chavez *et al.*, 2018; Iborra-Bendicho *et al.*, 2012; Praast *et al.*, 2011).

Estos nuevos ensayos están basados en antígenos recombinantes y utilizan tecnologías como la quimioluminiscencia o la electroquimioluminiscencia

para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi* en muestras de suero de pacientes con sospecha de EC. ARCHITECT® Chagas (ABBOTT), Chagas LIAISON® (DIASORIN) y Elecsys® Chagas (ROCHE) son los ensayos más utilizados en países no endémicos para el diagnóstico de EC, alcanzando mayor sensibilidad que aquellos ensayos basados en antígenos crudos (Flores-Chavez *et al.*, 2018; Iborra-Bendicho *et al.*, 2012).

El uso de CMIA para diagnosticar tanto a la madre como al hijo ha sido recomendado recientemente por el Grupo Técnico de la OMS para la “Prevención y Control de la Transmisión Congénita y el Manejo de los Casos de Infección Congénita por *Trypanosoma cruzi*” para el despistaje como test único (Carlier *et al.*, 2019), aunque los resultados positivos deben ser confirmado por otro test serológico convencional. Aunque se hayan publicado varios estudios sobre la utilidad de CMIA en el diagnóstico de EC (Iborra-Bendicho *et al.*, 2012; Praast *et al.*, 2011), los estudios acerca de su utilidad en el diagnóstico de ECC son limitados (Abras *et al.*, 2017). En este estudio, queremos evaluar el rendimiento de los ensayos de CMIA en el despistaje de EEC.

Los resultados obtenidos utilizando CMIA (S/CO) muestran que los niños que aclaran los anticuerpos maternos a los 6 meses de edad tenían menos niveles de anticuerpos al nacer ($6,64 \pm 1,99$) que aquellos que no negativizaron hasta los 9 ó 12 meses de edad ($9,44 \pm 2,27$ y $9,61 \pm 2,35$ respectivamente), por lo que es razonable asumir que cuanto menor sea el valor de CMIA al nacimiento, menor será el tiempo que deberá transcurrir para que los niños eliminen los anticuerpos maternos.

Por lo tanto, los valores de CMIA de los recién nacidos pueden utilizarse para predecir el tiempo al cual los niños aclararán por completo los anticuerpos maternos.

Conforme otros estudios han demostrado, los anticuerpos maternos pueden detectarse durante más tiempo por CMIA que por otros ensayos convencionales como la IFI (Abras *et al.*, 2017). Aproximadamente el 73% de los niños no infectados (48/66) tuvieron una serología positiva mediante CMIA a los 6 meses de edad y el 19% (10/52) a los 9 meses, aunque en este último control los valores de S/CO fueron cercanos al punto de corte ($1,7 \pm 0,76$). Por

otro lado, sólo el 16% (9/56) de los niños no infectados tuvieron un resultado positivo mediante IFI a los 6 meses de edad y a los 9 meses de edad todos los resultados de IFI fueron negativos.

Debido a la mayor sensibilidad de la técnica de CMIA con respecto a la IFI, la HA o los ELISA de antígenos crudos, su uso para el diagnóstico de ECC es controvertido. Dado que los anticuerpos maternos se detectan durante más tiempo con los ensayos de CMIA, estos ensayos deben de realizarse a una mayor edad para detectar el aclaramiento completo de anticuerpos maternos que con las técnicas serológicas tradicionales.

Nuestro estudio muestra que, desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad, se produce una caída de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* tanto mediante CMIA como IFI en pacientes infectados y no infectados. La señal obtenida por CMIA a los 6 meses de edad fue similar en todos los grupos de niños no infectados y en el caso de ECC ($3,19 \pm 2,60$ y $2,44$ respectivamente). No es hasta el 9º mes de vida en el que observamos un aumento de anticuerpos en el suero del niño infectado ($6,74$) y una disminución ($1,70 \pm 0,76$) o negativización de anticuerpos en los niños no infectados.

Estos datos apoyan nuestro algoritmo diagnóstico: si los estudios serológicos se realizan a la edad de 6 meses para diferenciar entre niños infectados y no infectados, sería casi imposible distinguirlos ya que los anticuerpos maternos están aún presentes en ambos casos y podría derivar en un resultado erróneo.

Por lo tanto, nuestra recomendación es la de realizar el ensayo de CMIA a los 9 meses de edad; si es negativo, podemos descartar la ECC; si es positivo, debemos realizar un ensayo de IFI para confirmar el diagnóstico.

Una de las limitaciones de nuestro estudio es la falta de casos de ECC en nuestra serie. Sólo hemos realizado el seguimiento de un niño infectado mediante CMIA y no se ha descrito ningún caso previamente ya que la mayoría de los niños infectados son diagnosticados antes del primer año de vida por métodos directos (PCR, microhematocrito) y son tratados para evitar la pérdida de seguimiento y el consiguiente fracaso terapéutico (Simón *et al.*, 2019).

En el presente estudio, se han analizado un gran número de niños de madre con EC que no han desarrollado la enfermedad y, que sepamos, este es el primer seguimiento mediante CMIA desde el nacimiento hasta los 12 meses de edad de un caso de ECC. En el futuro, sin embargo, sería necesario estudiar a un mayor número de niños infectados para corroborar nuestros hallazgos.

Aunque en este apartado nos hemos centrado en las técnicas serológicas para el diagnóstico de la ECC, el algoritmo diagnóstico que utilizamos en nuestro hospital incluye la realización de técnicas directas (microhematocrito y PCR) en el momento del parto y al mes de vida. Estas técnicas tienen menos sensibilidad que las técnicas serológicas, habiéndose publicado falsos positivos anteriormente (Volta *et al.*, 2018). En nuestro caso de ECC, tanto la PCR al nacer (sangre de cordón) como la realizada al primer mes de vida (sangre periférica) fueron negativas, por lo que el diagnóstico se realizó a los 10 meses de edad mediante CMIA e IFI; independientemente de que la PCR realizada en sangre periférica posteriormente fuera positiva (a los 14 meses de edad).

La infección congénita puede adquirirse en cualquier etapa del embarazo, por lo que los resultados falsos negativos obtenidos mediante PCR podrían deberse a una tardía adquisición de la infección, cerca del momento del parto, o incluso como resultado de una transmisión perinatal, lo que podría modificar la parasitemia (Luquetti *et al.*, 2015). Con esto en mente, es altamente recomendable la realización de estudios serológicos en cualquier recién nacido de madre con EC con el fin de evitar el incremento de niños infectados sin diagnosticar.

El diagnóstico temprano de la ECC es crucial, particularmente antes del primer año de vida, dado que el tratamiento en estas edades es bien tolerado con pocos o ningún efecto adverso y además su efectividad es prácticamente del 100% (Altcheh *et al.*, 2011; Freilij y Altcheh, 1995; Torrico *et al.*, 2004); cuando el tratamiento se retrasa más allá del primer año de vida, el tiempo hasta la seronegativización se incrementa y la enfermedad progresa, disminuyéndose tanto la tolerancia al tratamiento como la tasa de curación (Moscatelli *et al.*, 2019).

Centrándonos en nuestro caso de ECC, su tratamiento se vio retrasado después del diagnóstico (10 meses de edad) debido a la burocracia necesaria para acceder al medicamento y el tiempo que se empleó en contactar con sus padres. A pesar de todas estas dificultades, el paciente fue tratado a los 14 meses de edad sin ningún efecto adverso, disminuyendo sus valores de CMIA de 7,11 a 4,14 y su título de IFI de 1:320 a 1:80 en 30 meses, lo cual indica una adecuada respuesta terapéutica y la potencial total eliminación del parásito.

5 Coinfección de pacientes de Chagas con otros parásitos

Existen más de 2 billones de personas en el mundo infectadas por parásitos intestinales según datos de la Organización Mundial de la Salud, la mayoría de los cuales se encuentran en países subdesarrollados o en vías de desarrollo (OMS, 2005b). La OPS/OMS estima que entre el 20-30% de la población latinoamericana está infectada por parásitos intestinales, cifra que aumenta al 50% en las zonas más pobres e incluso hasta el 95% en algunas poblaciones indígenas (PAHO, 2007).

En Bolivia, los estudios realizados estiman que la prevalencia de infección por *S. stercoralis* se situaría en torno al 20% (Chammartin *et al.*, 2013; Gétaz *et al.*, 2019). En cuanto a la infección por *T. canis*, aunque no existen datos fiables sobre su seroprevalencia en la actualidad, algunos estudios de la década de los 90 la cifran entre el 27 y el 42% (Cancrini *et al.*, 1998). Por último, *Schistosoma sp.* sólo es endémico en unos pocos países de Latinoamérica (Brasil, Venezuela y la zona del Caribe), por lo que su seroprevalencia en Bolivia debería ser muy baja (Silva-Moraes *et al.*, 2019).

Los datos obtenidos en nuestro estudio revelan una diferencia significativa ($p < 0,0001$) entre la seroprevalencia de *S. stercoralis* y *T. canis* en los pacientes con EC (33,3% y 48,5%, respectivamente) y pacientes sin EC con sospecha de parasitosis (9,6% y 18,1%, respectivamente).

La diferencia en las condiciones higiénicas y la potabilización de las aguas de algunas regiones rurales bolivianas podrían explicar esta mayor seroprevalencia con respecto a España, ya que la estrongiloidiasis y la infección

por *T. canis* están ligadas a marcadores de bajo nivel socioeconómicos como la pobreza (Hotez y Wilkins, 2009).

Dado que el hombre actúa como hospedador paraténico en la infección por *T. canis* y las larvas no siguen su ciclo habitual, la utilidad del serodiagnóstico en *T. canis* es mayor que en otras enfermedades parasitarias, de hecho, es uno de los pocos parásitos humanos cuyo serodiagnóstico utiliza antígenos estandarizados (antígenos TES) (Smith *et al.*, 2009).

En cuanto a los resultados obtenidos de seroprevalencia de *Schistosoma sp.*, al ser tanto España como Bolivia zonas no endémicas de esquistosomiasis, es de esperar que no encontremos diferencias significativas entre ambas ($p=0,93$).

Sin embargo, la elevada seroprevalencia encontrada en ambos países (24,4 % en Bolivia y 18,1% en España) en pacientes sin sintomatología de infección por *Schistosoma sp.*, nos hace sospechar que la detección de anticuerpos anti-*S. mansoni* pueda deberse a otra infección parasitaria concomitante.

La reactividad cruzada intraespecie de los anticuerpos de *Schistosoma sp.* ha sido ampliamente estudiada (Bahgat *et al.*, 2001; Losada *et al.*, 2005; Rege *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1976). Además, también se ha reportado reactividad cruzada con anticuerpos frente a otros helmintos como anti-*Fasciola hepática* (Aronstein *et al.*, 1985; Maghraby *et al.*, 2009), anti-*Ascaris lumbricoides* y anti-*Ancylostoma sp.* (Correa-Oliveira *et al.*, 1988). Si bien esta característica puede utilizarse eventualmente para el desarrollo de vacunas o estudios filogenéticos, provoca que la especificidad de los ELISA anti-*Schistosoma sp.* disminuya.

De los 80 pacientes con serología positiva para *S. mansoni*, se les realizó la serología de *S. stercoralis* a 55 de ellos y la serología de *T. canis* a 27. De todos ellos, 14 (25,5%) fueron positivos para *S. stercoralis* y *S. mansoni* y 9 (33,3%) positivos para *T. canis* y *S. mansoni*.

Los pacientes positivos para *S. mansoni* y *S. stercoralis* poseían un índice medio de $2,59 \pm 1,48$ para *S. mansoni* y $6,25 \pm 3,67$ para *S. stercoralis* y, aunque

no se han encontrado indicios de reactividad cruzada entre estos 2 parásitos en la literatura, es más probable que el bajo índice obtenido por *S. mansoni* sea debido a una reactividad cruzada con los anticuerpos de *S. stercoralis*.

En cuanto a los pacientes positivos para *S. mansoni* y *T. canis*, los índices de los ELISA son de $2,80 \pm 1,37$ para *S. mansoni* y $2,79 \pm 1,16$ para *T. canis*, por lo que no podemos diferenciar cuál de los dos parásitos está generando reactividad cruzada con el otro.

No obstante, no disponemos de los datos suficientes para dilucidar si son estas enfermedades parasitarias las que están provocando la reactividad cruzada del ensayo Schistosoma mansoni IgG ELISA (DRG Instruments, Alemania) o hay otra causa concomitante.

En algunos estudios realizados en zona endémica, la probabilidad de padecer estrongiloidiasis en pacientes con EC es 2 veces mayor que en personas sin EC (Puerta-Alcalde *et al.*, 2018). Además, estudios realizados en zona no endémica de EC han obtenido prevalencias de estrongiloidiasis del 18% en pacientes infectados por *T. cruzi* (Salvador *et al.*, 2016).

La alta seroprevalencia de anticuerpos de *S. stercoralis* encontrada en los pacientes con EC (56%) con respecto a la observada en los estudios previamente descritos (Puerta-Alcalde *et al.*, 2018; Salvador *et al.*, 2016) puede ser debida al alto porcentaje de pacientes con eosinofilia (70,5%) de nuestro estudio.

Las diferencias significativas encontradas en las seroprevalencias de *S. stercoralis* entre la región de Cochabamba y las regiones de Santa Cruz y Chuquisaca ($p=0,0001$ y $p=0,01$, respectivamente) coinciden con otros estudios realizados en los diferentes departamentos bolivianos. Esto se debe a la altitud de Cochabamba (2.558 metros), la cual provoca que las condiciones climáticas no sean favorables para el desarrollo de los nemátodos y, por consiguiente, su seroprevalencia e infecciones son menores en esta región con respecto a Santa Cruz y Chuquisaca (Chammartin *et al.*, 2013).

Dado que la infección por *S. stercoralis* es asintomática o cursa con síntomas leves, el estudio de algunos biomarcadores como la eosinofilia

(respuesta inmunitaria frente a la infección por *S. stercoralis* y otros geohelminthos) para sospechar infección por dicho agente se utiliza habitualmente en la práctica clínica (Czeresnia y Weiss, 2022).

Si bien se obtiene una muy buena sensibilidad en la detección de anticuerpos de *S. stercoralis* según la presencia de eosinofilia en nuestra serie de pacientes (S=95,7%), el hecho de que este marcador sea inespecífico y pueda verse alterado por otras patologías hace que su especificidad sea baja (S=61,5%).

Además, la eosinofilia en los pacientes crónicos infectados por *S. stercoralis* es intermitente, y en algunas series tan solo el 60% de los casos cursan con eosinofilia. Aun así, se correlaciona mejor que en las infecciones por otros helmintos, esto se debe a que las hembras de *S. stercoralis* habitan en la submucosa intestinal y activan más al sistema inmunitario que los parásitos que se sitúan en el lumen intestinal, estimulando así la producción de eosinófilos (Requena-Méndez *et al.*, 2013).

En nuestro estudio, encontramos 44 pacientes con eosinofilia y negativos para anticuerpos de *S. stercoralis* en los que la causa de la eosinofilia podría ser otra enfermedad concomitante.

Para la mayoría de ellos se encontró la causa (rinitis alérgica, dermatitis atópica, asma, otra etiología infecciosa o infección pasada por *S. stercoralis*), excepto para 7 pacientes, en los que causa de la eosinofilia no pudo ser filiada.

Teniendo en cuenta que la eosinofilia es un marcador inespecífico, una buena anamnesis nos puede ayudar a descartar otras patologías que puedan causar este aumento de eosinófilos antes de realizar el estudio microbiológico para descartar estrongiloidiasis.

Tradicionalmente, el diagnóstico de estrongiloidiasis se ha basado en la realización de exámenes de heces mediante visión microscópica directa utilizando métodos de concentración para aumentar la sensibilidad de la técnica. Gracias a la técnica de Baermann o a la del cultivo-migración en placa se han conseguido alcanzar sensibilidades de 72% y 89%, respectivamente (Campo Polanco *et al.*, 2014; Requena-Méndez *et al.*, 2013). La detección de las larvas

de *S. stercoralis* (tanto en heces como en lavado broncoalveolar) sigue siendo el *gold standard* para el diagnóstico de estrongiloidiasis, sin embargo, estas técnicas son tediosas de realizar, consumen mucho tiempo y poseen una baja sensibilidad (Hailu *et al.*, 2022).

Asimismo, la muestra utilizada para el diagnóstico de estrongiloidiasis crónica son las heces, lo cual imposibilita el obtener la muestra del paciente en la primera visita y dificulta el obtener un diagnóstico definitivo, ya que muchos de los pacientes provienen de zonas rurales y deben desplazarse y dejar de trabajar para poder entregar la muestra en el hospital.

En nuestro estudio no disponemos de muestras de heces de los pacientes, si bien otros autores han demostrado que para alcanzar una sensibilidad del 50% en el examen microscópico se deben recoger al menos 3 muestras, sensibilidad que aumenta al 100% si se examinan un total de 7 muestras (Dreyer *et al.*, 1996; Uparanukraw *et al.*, 1999).

La muestra de suero, en cambio, es de fácil extracción y nos permite, además de establecer la presunción diagnóstica, tener un valor inicial postratamiento que podremos comparar con el obtenido tras el tratamiento con el fin de dilucidar si el paciente ha alcanzado la curación. Algunos autores postulan que la curación serológica se consigue cuando la ratio del índice postratamiento/pre-tratamiento es menor de 0,6, y la utilizan como una herramienta para el seguimiento del tratamiento de estrongiloidiasis (Bon *et al.*, 2010; Fernando Salvador *et al.*, 2014).

En la literatura existen varios esquemas de tratamiento para la estrongiloidiasis, siendo las moléculas más utilizadas la ivermectina y el albendazol, bien sea en dosis única o en múltiples dosis. Las tasas de curación serológica varían desde el 40% en pacientes tratados con albendazol durante 3 días (400mg/día) al 83% en pacientes tratados con ivermectina en régimen múltiple (2 dosis de 200µg/kg/día) en controles (Karunajeewa *et al.*, 2006; Page *et al.*, 2006).

En nuestro trabajo, el 80% de los pacientes cumplió el criterio de curación un año después del tratamiento por la técnica de DRG y el 70% por la técnica de Euroimmun después de recibir el tratamiento con ivermectina (2 dosis de

200µg/kg/día). Tres de los 5 pacientes que no cumplieron el criterio de curación por ninguna de las 2 técnicas obtuvieron un ratio <1 y, además, 4 de estos 5 pacientes fueron reexaminados al segundo año postratamiento por la técnica de DRG, cumpliendo todos ellos el criterio de curación.

Sin embargo, si no se hubiera aplicado este criterio, tan solo el 16,7% (5/30) y el 36,7% (11/30) se hubieran considerado negativos mediante Euroimmun y DRG, respectivamente, por lo que el criterio de curación serológica puede ser una herramienta útil para realizar el seguimiento de los pacientes al año postratamiento, ya que estos pueden tardar varios años en seronegativizar.

Otro estudio similar en España en pacientes tratados con ivermectina en régimen múltiple mostró un porcentaje de curación serológica del 81,3% a los 6 meses postratamiento (Fernando Salvador *et al.*, 2014), lo que sugiere que los controles serológicos podrían realizarse a los 6 meses para comprobar si el paciente está respondiendo al tratamiento y en caso de no ser así, repetir al año.

En cuanto a la eosinofilia, la media obtenida en los pacientes antes del tratamiento y 1 año postratamiento disminuyó de manera significativa ($p < 0,001$), lo que indicaría la eliminación del parásito y la consiguiente inactivación de la respuesta inmune celular tipo Th2.

Si bien mediante la técnica de DRG se clasificó a más pacientes como curados serológicamente con respecto a la técnica de Euroimmun (80% vs 70%), los pacientes discordantes también obtuvieron una disminución de anticuerpos del 23% de media por Euroimmun, por lo que no se puede descartar la equivalente utilidad de esta técnica en controles serológicos más largos.

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. La técnica de CMIA para el diagnóstico de EC posee una gran robustez y reproducibilidad careciendo de errores aleatorios o sistemáticos según las reglas de Westgard.
2. El uso de los controles de calidad externos del PNCQ y OMS confirma que las técnicas evaluadas (CMIA, IFI e ICT) son adecuadas para el diagnóstico serológico de EC.
3. Se ha podido establecer una posible equivalencia entre los valores de CMIA y los títulos de anticuerpos de IFI en los pacientes con EC, lo que nos permitiría asignar un título de anticuerpos a determinados rangos de valor (S/CO) de CMIA.
4. El Límite de Detección (LOD) de las técnicas de biología molecular evaluadas para la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* se sitúa entre $1,9 \times 10^{-2}$ - $1,9 \times 10^{-3}$ copias/ μ l, lo que nos permite detectar valores de parasitemia inferiores a los detectables por las técnicas parasitológicas convencionales.
5. Las técnicas comerciales de biología molecular evaluadas, en concreto RT-PCR, poseen una buena concordancia con la PCR convencional.
6. La técnica de CMIA puede ser una herramienta diagnóstica útil como único ensayo serológico a los 9 meses de edad para descartar o confirmar ECC.
7. Los pacientes con EC poseen una mayor seroprevalencia de *Strongyloides stercoralis* y *Toxocara canis* que los pacientes sin EC con sospecha de parasitosis; sin embargo, no existen diferencias significativas en la seroprevalencia de *Schistosoma sp.* entre ambas cohortes.

8. Las técnicas serológicas utilizadas para la detección de anticuerpos anti-*S. stercoralis* poseen una muy buena sensibilidad y especificidad; además, la cinética de anticuerpos de *S. stercoralis* nos permite el empleo de éstas para la monitorización de la eficacia del tratamiento.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abras, A., Muñoz, C., Ballart, C., Berenguer, P., Llovet, T., Herrero, M., Tebar, S., Pinazo, M.-J., Posada, E., Martí, C., Fumadó, V., Bosch, J., Coll, O., Juncosa, T., Ginovart, G., Armengol, J., Gascón, J., Portús, M., Gállego, M., 2017. Towards a New Strategy for Diagnosis of Congenital *Trypanosoma cruzi* Infection. *J. Clin. Microbiol.* 55, 1396–1407. <https://doi.org/10.1128/JCM.02248-16>
- Alarcón de Noya, B., Colmenares, C., Díaz-Bello, Z., Ruiz-Guevara, R., Medina, K., Muñoz-Calderón, A., Mauriello, L., Cabrera, E., Montiel, L., Losada, S., Martínez, J., Espinosa, R., Abate, T., 2016. Orally-transmitted Chagas disease: Epidemiological, clinical, serological and molecular outcomes of a school microepidemic in Chichiriviche de la Costa, Venezuela. *Parasite Epidemiol. Control* 1, 188–198. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.005>
- Al-Hasan, M.N., McCormick, M., Ribes, J.A., 2007. Invasive enteric infections in hospitalized patients with underlying strongyloidiasis. *Am. J. Clin. Pathol.* 128, 622–627. <https://doi.org/10.1309/PK0RDQWB764C3WQ2>
- Alonso-Padilla, J., Gallego, M., Schijman, A.G., Gascon, J., 2017. Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 17, 699–710. <https://doi.org/10.1080/14737159.2017.1338566>
- Alonso-Vega, C., Billot, C., Torrico, F., 2013. Achievements and Challenges upon the Implementation of a Program for National Control of Congenital Chagas in Bolivia: Results 2004–2009. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002304>
- Altcheh, J., Moscatelli, G., Mastrantonio, G., Moroni, S., Giglio, N., Marson, M.E., Ballering, G., Bisio, M., Koren, G., García-Bournissen, F., 2014. Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e2907. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002907>
- Altcheh, J., Moscatelli, G., Moroni, S., Garcia-Bournissen, F., Freilij, H., 2011. Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease. *Pediatrics* 127, e212-218. <https://doi.org/10.1542/peds.2010-1172>

- Álvarez, M.G., Hernández, Y., Bertocchi, G., Fernández, M., Lococo, B., Ramírez, J.C., Cura, C., Albizu, C.L., Schijman, A., Abril, M., Sosa-Estani, S., Viotti, R., 2016. New Scheme of Intermittent Benznidazole Administration in Patients Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*: a Pilot Short-Term Follow-Up Study with Adult Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 833–837. <https://doi.org/10.1128/AAC.00745-15>
- 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, 540–550. <https://doi.org/10.2450/2015.0040-15>
- Aronstein, W.S., Dalton, J.P., Weiss, J.B., Strand, M., 1985. Identification and characterization of a major *Schistosoma mansoni* glycoprotein antigen cross-reactive with *Fasciola hepatica*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 879–888. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1985.34.879>
- Avendaño, C., Patarroyo, M.A., 2020. Loop-Mediated Isothermal Amplification as Point-of-Care Diagnosis for Neglected Parasitic Infections. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7981. <https://doi.org/10.3390/ijms21217981>
- Azogue, E., Darras, C., 1991. Estudio prospectivo de la enfermedad de chagas en recién nacidos con infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 24, 105–109. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821991000200007>
- Bahgat, M., Francklow, K., Doenhoff, M.J., Li, Y.L., Ramzy, R.M., Kirsten, C., Ruppel, A., 2001. Infection induces antibodies against the cercarial secretions, but not against the cercarial elastases of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* and *Trichobilharzia ocellata*. *Parasite Immunol.* 23, 557–565. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3024.2001.00417.x>
- Barcán, L., Luna, C., Lunaó, C., Clara, L., Sinagra, A., Valledor, A., De Rissio, A.M., De Rissio, A.M., Gadano, A., Gadanoá, A., García, M.M., de Santibañes, E., Riarte, A., 2005. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. *Liver Transplant. Off. Publ. Am.*

- Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc. 11, 1112–1116.
<https://doi.org/10.1002/lt.20522>
- Barfield, C.A., Barney, R.S., Crudder, C.H., Wilmoth, J.L., Stevens, D.S., Mora-Garcia, S., Yanovsky, M.J., Weigl, B.H., Yanovsky, J., 2011. A Highly Sensitive Rapid Diagnostic Test for Chagas Disease That Utilizes a Recombinant *Trypanosoma cruzi* Antigen. IEEE Trans. Biomed. Eng. 58, 814–817.
<https://doi.org/10.1109/TBME.2010.2087334>
- Basile, L., Ciruela, P., Requena-Méndez, A., Vidal, M.J., Dopico, E., Martín-Nalda, A., Sulleiro, E., Gascon, J., Jané, M., 2019. Epidemiology of congenital Chagas disease 6 years after implementation of a public health surveillance system, Catalonia, 2010 to 2015. Eurosurveillance 24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.26.19-00011>
- Basile, L., Jansa, J.M., Carlier, Y., Salamanca, D.D., Angheben, A., Bartoloni, A., Seixas, J., Van Gool, T., Canavate, C., Flores-Chavez, M., Jackson, Y., Chiodini, P.L., Albajar-Vinas, P., Working Group on Chagas Disease, 2011. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull. 16.
- Basombrio, M., Nasser, J., Segura, M., Marco, J., Negrette, O., Padilla, M., Mora, M., 1999. The transmission of Chagas disease in Salta and the detection of congenital cases. Medicina (Mex.) 59 Suppl 2, 143–6.
- Bern, C., 2015. Chagas' Disease. N. Engl. J. Med. 373, 456–466.
<https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Bern, C., Montgomery, S.P., 2009. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am. 49, e52-54.
<https://doi.org/10.1086/605091>
- 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, 2171–2181.
<https://doi.org/10.1001/jama.298.18.2171>

- Bern, C., Montgomery, S.P., Katz, L., Caglioti, S., Stramer, S.L., 2008. Chagas disease and the US blood supply. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 476–482. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32830ef5b6>
- Berrizbeitia, M., Ndao, M., Bubis, J., Gottschalk, M., Aché, 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>
- Besuschio, S.A., Llano Murcia, M., Benatar, A.F., Monnerat, S., Cruz, I., Picado, A., Curto, M. de los Á., Kubota, Y., Wehrendt, D.P., Pavia, P., Mori, Y., Puerta, C., Ndung'u, J.M., Schijman, A.G., 2017. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005779. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005779>
- Besuschio, S.A., Picado, A., Muñoz-Calderón, A., Wehrendt, D.P., Fernández, M., Benatar, A., Diaz-Bello, Z., Iruetia, C., Cruz, I., Ndung'u, J.M., Cafferata, M.L., Montenegro, G., Sosa Estani, S., Lucero, R.H., Alarcón de Noya, B., Longhi, S.A., Schijman, A.G., 2020. *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008402. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008402>
- Bittencourt, A.L., Sadigursky, M., Barbosa, H.S., 1975. [Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 17, 146–159.
- Bon, B., Houze, S., Talabani, H., Magne, D., Belkadi, G., Develoux, M., Senghor, Y., Chandener, J., Ancelle, T., Hennequin, C., 2010. Evaluation of a Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Strongyloidiasis. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1716–1719. <https://doi.org/10.1128/JCM.02364-09>
- Brasil, P.E.A.A., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A.M., Sangenis, L.H.C., Braga, J.U., 2010. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect. Dis.* 10, 337. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-337>

- Brener, Z., 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27, 347–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>
- Brindley, P.J., Sher, A., 1987. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. J. Immunol. Baltim. Md 1950 139, 215–220.
- Britto, C., Cardoso, M.A., Wincker, P., Morel, C.M., 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 88, 171–172. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761993000100030>
- Brossas, J.-Y., Griselda, B., Bisio, M., Guihenneuc, J., Gulin, J.E.N., Jauréguiberry, S., Lescure, F.-X., Fekkar, A., Mazier, D., Altcheh, J., Paris, L., 2021. Evaluation of the Chagas Western Blot IgG Assay for the Diagnosis of Chagas Disease. Pathogens 10, 1455. <https://doi.org/10.3390/pathogens10111455>
- Brumpt, E., 1914. Le Xénodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la Trypanosomose de Chagas. Bull. Société Pathol. Exot. 7, 706–710.
- Brutus, L., Castillo, H., Bernal, C., Salas, N.A., Schneider, D., Santalla, J.-A., Chippaux, J.-P., 2010. Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital Chagas disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 83, 1044–1047. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0326>
- Bua, J., Volta, B.J., Perrone, A.E., Scollo, K., Velázquez, E.B., Ruiz, A.M., Rissio, A.M.D., Cardoni, R.L., 2013. How to Improve the Early Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Relationship between Validated Conventional Diagnosis and Quantitative DNA Amplification in Congenitally Infected Children. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2476. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002476>
- Bua, J., Volta, B.J., Velazquez, E.B., Ruiz, A.M., Rissio, A.M.D., Cardoni, R.L., 2012. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 106, 623–628. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.03.015>

- Burke, M.L., Jones, M.K., Gobert, G.N., Li, Y.S., Ellis, M.K., McManus, D.P., 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol.* 31, 163–176. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01098.x>
- Burleigh, B.A., Andrews, N.W., 1995. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 175–200. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.001135>
- Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., Umezawa, E.S., 2007a. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 14, 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00127-07>
- Caballero, Z.C., Sousa, O.E., Marques, W.P., Saez-Alquezar, A., Umezawa, E.S., 2007b. Evaluation of Serological Tests To Identify *Trypanosoma cruzi* Infection in Humans and Determine Cross-Reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 14, 1045–1049. <https://doi.org/10.1128/CVI.00127-07>
- Campbell, D.A., Westenberger, S.J., Sturm, N.R., 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr. Mol. Med.* 4, 549–562. <https://doi.org/10.2174/1566524043360249>
- Campo Polanco, L., Gutiérrez, L.A., Cardona Arias, J., 2014. Diagnosis of *Strongyloides Stercoralis* infection: meta-analysis on evaluation of conventional parasitological methods (1980-2013). *Rev. Esp. Salud Pública* 88, 581–600. <https://doi.org/10.4321/S1135-57272014000500004>
- Cancrini, G., Bartoloni, A., Zaffaroni, E., Guglielmetti, P., Gamboa, H., Nicoletti, A., Genchi, C., 1998. Seroprevalence of *Toxocara canis*-IgG antibodies in two rural Bolivian communities. *Parassitologia* 40, 473–475.
- Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A.O., Schijman, A.G., Segovia, M., Wagner, N., Albajar Vinas, P., 2019. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women.

- PLoS Negl. Trop. Dis. 13, e0007694.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007694>
- Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., Vinas, P.A., 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>
- Carlier, Y., Truyens, C., 2015. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. Acta Trop. 151, 103–115.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.016>
- Carlier, Y., Truyens, C., 2010. Maternal–Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*, in: American Trypanosomiasis. pp. 539–581. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384876-5.00022-8>
- Carod-Artal, F.J., 2006. Enfermedad de Chagas e ictus. Neurología 21, 135–149.
- Carrilero, B., Murcia, L., Martínez-Lage, L., Segovia, M., 2011. Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country. Rev. Espanola Quimioter. Publicacion Of. Soc. Espanola Quimioter. 24, 123–126.
- Castro, C., Hernandez, E.B., Rezende, J., Prata, A., 2010. [Radiological study on megacolon cases in an endemic area for Chagas disease]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 43, 562–566. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822010000500018>
- Ceballos-Pomares, J.C., Cuéllar-Rufino, S., Vazquez-Ortega, M.F., López-Dominguez, J., Romero-Cruz, V., Calderón-Garcidueñas, A.L., 2017. Inmunología de la enfermedad de Chagas congénita. Perinatol. Reprod. Humana 31, 144–150.
<https://doi.org/10.1016/j.rprh.2018.01.001>
- Chagas, C., Chagas, C., 1911. Nova entidade morbida do homem: rezumo geral de estudos etiologicos e clinicos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 3, 219–275.
<https://doi.org/10.1590/S0074-02761911000200003>
- Chagas, C., Chagas, C., 1909. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente

etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1, 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>

Chammartin, F., Scholte, R.G., Malone, J.B., Bavia, M.E., Nieto, P., Utzinger, J., Vounatsou, P., 2013. Modelling the geographical distribution of soil-transmitted helminth infections in Bolivia. *Parasit. Vectors* 6, 152. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-152>

Chang, C.-D., Cheng, K.Y., Jiang, L.X., Salbilla, V.A., Haller, A.S., Yem, A.W., Bryant, J.D., Kirchhoff, L.V., Leiby, D.A., Schochetman, G., Shah, D.O., 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, 1737–1744. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2006.00965.x>

Cheng, K.Y., Chang, C.-D., Salbilla, V.A., Kirchhoff, L.V., Leiby, D.A., Schochetman, G., Shah, D.O., 2007. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Vaccine Immunol. CVI* 14, 355–361. <https://doi.org/10.1128/CVI.00401-06>

Chocair, P.R., Sabbaga, E., Amato Neto, V., Shiroma, M., de Goes, G.M., 1981. [Kidney transplantation: a new way of transmitting chagas disease]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 23, 280–282.

Ciapponi, A., Barreira, F., Perelli, L., Bardach, A., Gascón, J., Molina, I., Morillo, C., Prado, N., Riarte, A., Torrico, F., Ribeiro, I., Villar, J.C., Sosa-Estani, S., 2020. Fixed vs adjusted-dose benznidazole for adults with chronic Chagas disease without cardiomyopathy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008529. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008529>

Cohen, J., 1960. A Coefficient of Agreement for Nominal Scales. *Educ Psychol Meas* 20, 37–46.

Colley, D.G., Bustinduy, A.L., Secor, W.E., King, C.H., 2014. Human schistosomiasis. *Lancet Lond. Engl.* 383, 2253–2264. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61949-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61949-2)

Correa-Oliveira, R., Dusse, L.M., Viana, I.R., Colley, D.G., Santos Carvalho, O., Gazzinelli, G., 1988. Human antibody responses against *Schistosomal* antigens.

I. Antibodies from patients with *Ancylostoma*, *Ascaris lumbricoides* or *Schistosoma mansoni* infections react with schistosome antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38, 348–355.

Coura, J.R., de Abreu, L.L., Pereira, J.B., Willcox, H.P., 1985. [Morbidity in Chagas' disease. IV. Longitudinal study of 10 years in Pains and Iguatama, Minas Gerais, Brazil]. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 80, 73–80. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761985000100011>

Coura, J.R., Dias, J.C.P., 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 31–40. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000900006>

Coura, J.R., Junqueira, A.C., 2012. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 145–154. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000200001>

Coura, J.R., Viñas, P.A., 2010. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 465, S6-7. <https://doi.org/10.1038/nature09221>

Cunha-Neto, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., De Messias, I., Stolf, N., Bellotti, G., Patarroyo, M.E., Pilleggi, F., Kalil, J., 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3541–3545. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.8.3541>

Czeresnia, J.M., Weiss, L.M., 2022. *Strongyloides stercoralis*. *Lung* 200, 141–148. <https://doi.org/10.1007/s00408-022-00528-z>

de Andrade, A.L., Zicker, F., de Oliveira, R.M., Almeida Silva, S., Luquetti, A., Travassos, L.R., Almeida, I.C., de Andrade, S.S., de Andrade, J.G., Martelli, C.M., 1996. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet Lond. Engl.* 348, 1407–1413. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)04128-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)04128-1)

de Moraes, M.H., Guarneri, A.A., Girardi, F.P., Rodrigues, J.B., Eger, I., Tyler, K.M., Steindel, M., Grisard, E.C., 2008. Different serological cross-reactivity of

Trypanosoma rangeli forms in *Trypanosoma cruzi*-infected patients sera. *Parasit. Vectors* 1, 20. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-1-20>

de Oliveira, R.B., Troncon, L.E., Dantas, R.O., Menghelli, U.G., 1998. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Gastroenterol.* 93, 884–889. https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.1998.270_r.x

de Rissio, A.M., Scollo, K., Cardoni, R.L., 2009. [Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina]. *Medicina (Mex.)* 69, 529–535.

Deane LM, 1964. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 16, 27–48.

Dias, J.C., 1989. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 22, 147–156. <https://doi.org/10.1590/s0037-86821989000300007>

Dias, J.C.P., Silveira, A.C., Schofield, C.J., 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97, 603–612. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000500002>

Díaz, M.L., González, C.I., 2014. Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Rev. Univ. Ind. Santander Salud* 46, 177–188.

Diez, M., Favaloro, L., Bertolotti, A., Burgos, J.M., Vigliano, C., Lastra, M.P., Levin, M.J., Arnedo, A., Nagel, C., Schijman, A.G., Favaloro, R.R., 2007. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 7, 1633–1640. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2007.01820.x>

Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659–667. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328318978f>

Dreyer, G., Fernandes-Silva, E., Alves, S., Rocha, A., Albuquerque, R., Addiss, D., 1996. Patterns of detection of *Strongyloides stercoralis* in stool specimens: implications for diagnosis and clinical trials. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2569–2571.

- Duffy, T., Bisio, M., Altcheh, 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>
- Elefant, G.R., Roldán, W.H., Seeböck, A., Kosma, P., 2016. Evaluation of a di-O-methylated glycan as a potential antigenic target for the serodiagnosis of human toxocariasis. *Parasite Immunol.* 38, 236–243. <https://doi.org/10.1111/pim.12311>
- Escalante, H., Jara, C., Davelois, K., Iglesias, M., Benites, A., Espinoza, R., 2014. Estandarización de la técnica de western blot para el diagnóstico específico de la enfermedad de Chagas utilizando antígenos de excreción-secreción de los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica* 31, 644–651.
- Espinosa, R., Carrasco, H.A., Belandria, F., Fuenmayor, A.M., Molina, C., González, R., Martínez, O., 1985. Life expectancy analysis in patients with Chagas' disease: prognosis after one decade (1973-1983). *Int. J. Cardiol.* 8, 45–56. [https://doi.org/10.1016/0167-5273\(85\)90262-1](https://doi.org/10.1016/0167-5273(85)90262-1)
- Fairfax, K., Nascimento, M., Huang, S.C.-C., Everts, B., Pearce, E.J., 2012. Th2 responses in schistosomiasis. *Semin. Immunopathol.* 34, 863–871. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0354-4>
- Feilij, H., Muller, L., Gonzalez Cappa, S.M., 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* 18, 327–330.
- Fernandes, O., Mangia, R.H., Lisboa, C.V., Pinho, A.P., Morel, C.M., Zingales, B., Campbell, D.A., Jansen, A.M., 1999. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-

transcribed spacer of the mini-exon gene. *Parasitology* 118 (Pt 2), 161–166.
<https://doi.org/10.1017/s0031182098003709>

Fernández-Villegas, A., Pinazo, M.J., Marañón, C., Thomas, M.C., Posada, E., Carrilero, B., Segovia, M., Gascon, J., López, M.C., 2011. Short-term follow-up of chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. *BMC Infect. Dis.* 11, 206. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-11-206>

Figuera, L., Ramírez, E., Merchán, E., 2002. *Strongyloides stercoralis*: Prevalencia y evaluación del diagnóstico utilizando cuatro métodos coproparasitológicos. *Rev. Soc. Venez. Microbiol.* 22, 199–202.

Finsterer, J., Auer, H., 2007. Neurotoxocarosis. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 279–287. <https://doi.org/10.1590/s0036-46652007000500002>

Fleury, M.K., Menezes, M.E., Correa, J.A., 2017. Implementation of the External Quality Assessment Program in Brazil. *Biochem. Medica* 27, 93–96.
<https://doi.org/10.11613/BM.2017.012>

Flores-Chávez, M., Cruz, I., Rodríguez, M., Nieto, J., Franco, E., Gárate, T., Cañavate, C., 2010. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 28, 284–293.
<https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.07.005>

Flores-Chávez, M., Fernández, B., Puente, S., Torres, P., Rodríguez, M., Monedero, C., Cruz, I., Gárate, T., Cañavate, C., 2008. Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, e44-47.
<https://doi.org/10.1086/527448>

Flores-Chávez, M., Fuentes, I. de, Gárate, T., Cañavate, C., 2007. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 25, 29–37.

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 Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies

in a Multicenter Study in Europe and Latin America. *J. Clin. Microbiol.* 56. <https://doi.org/10.1128/JCM.01446-17>

Francisco-González, L., Gastañaga-Holguera, T., Jiménez Montero, B., Daoud Pérez, Z., Illán Ramos, M., Merino Amador, P., Herráiz Martínez, M.Á., Ramos Amador, J.T., 2018. Seroprevalencia y transmisión vertical de enfermedad de Chagas en una cohorte de gestantes latinoamericanas en un hospital terciario de Madrid. *An. Pediatría* 88, 122–126. <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2017.03.003>

Freilij, H., Altchek, J., 1995. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 21, 551–555. <https://doi.org/10.1093/clinids/21.3.551>

Garcia, A., Ortiz, S., Iribarren, C., Bahamonde, M.I., Solari, A., 2014. Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages. *Parasitol. Int.* 63, 138–139. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.10.010>

Garcia-Bournissen, F., Altchek, J., Giglio, N., Mastrantonio, G., Della Vedova, C., Koren, G., 2009. Pediatric clinical pharmacology studies in Chagas disease: focus on Argentina. *Paediatr. Drugs* 11, 33–7.

Gétaz, L., Castro, R., Zamora, P., Kramer, M., Gareca, N., Torrico-Espinoza, M. del C., Macias, J., Lisarazu-Velásquez, S., Rodriguez, G., Valencia-Rivero, C., Perneger, T., Chappuis, F., 2019. Epidemiology of *Strongyloides stercoralis* infection in Bolivian patients at high risk of complications. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007028. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007028>

Gil-Gallardo, L., Simón, M., Iborra, A., Carrilero, B., Segovia, M., 2021. Chemiluminescent Microparticle Immunoassay for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease: A Prospective Study in Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 105, 1701–1705. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.21-0332>

Grove, D.I., 1996. Human strongyloidiasis. *Adv. Parasitol.* 38, 251–309. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60036-6](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60036-6)

Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet Lond. Engl.* 368, 1106–1118. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69440-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69440-3)

- Guerreiro, C., Machado, A., 1913. Da reação de Bordet e Gengou na molétia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil Med* 27, 225–226.
- Guhl, F., 2009. Enfermedad de Chagas: Realidad y perspectivas. *Rev. Bioméd.* 20, 228–234.
- Hailu, T., Amor, A., Nibret, E., Munshea, A., Anegagrie, M., Flores-Chavez, M.D., Tang, T.-H.T., Saugar, J.M., Benito, A., 2022. Evaluation of five diagnostic methods for *Strongyloides stercoralis* infection in Amhara National Regional State, northwest Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* 22, 297. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07299-1>
- Henriquez-Camacho, C., Gotuzzo, E., Echevarria, J., White Jr, A.C., Terashima, A., Samalvides, F., Pérez-Molina, J.A., Plana, M.N., 2016. Ivermectin versus albendazole or thiabendazole for *Strongyloides stercoralis* infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2016. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007745.pub3>
- Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F., Carlier, Y., 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-gamma in response to parasite antigens. *J. Infect. Dis.* 189, 1274–1281. <https://doi.org/10.1086/382511>
- Herwaldt, B.L., 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 659–688, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.659-688.2001>
- Hotez, P.J., Wilkins, P.P., 2009. Toxocariasis: America's Most Common Neglected Infection of Poverty and a Helminthiasis of Global Importance? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e400. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000400>
- Howard, E.J., Xiong, X., Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Buekens, P., 2014. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG Int. J. Obstet. Gynaecol.* 121, 22–33. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12396>
- Iborra-Bendicho, M., Albert, M., Márquez-Contreras, C., Segovia-Hernández, M., 2012. ARCHITECT Chagas®: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 30, 463–465. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.02.002>

- Igual Adell, R., Domínguez Márquez, V., 2007. Estrongiloidiasis: epidemiología, manifestaciones clínicas y diagnóstico. Experiencia en una zona endémica: la comarca de La Safor (Valencia). *Enfermedades Infecc. Microbiol. Clínica* 25, 38–44.
- Jannin, J., Villa, L., 2007. An overview of Chagas disease treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 95–97. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000106>
- Karunajeewa, H., Kelly, H., Leslie, D., Leydon, J., Saykao, P., Biggs, B.-A., 2006. Parasite-specific IgG response and peripheral blood eosinophil count following albendazole treatment for presumed chronic strongyloidiasis. *J. Travel Med.* 13, 84–91. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8305.2006.00004.x>
- Kierszenbaum, F., Diego, J.L. de, Fresno, M., Szein, M.B., 1999. Inhibitory effects of the *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein AGC10 on the expression of IL-2 receptor chains and secretion of cytokines by subpopulations of activated human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29, 1684–1691. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199905\)29:05<1684::AID-IMMU1684>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1684::AID-IMMU1684>3.0.CO;2-7)
- Kirchhoff, L.V., Gam, A.A., Gusmao, R.A., Goldsmith, R.S., Rezende, J.M., Rassi, A., 1987. Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody to the 72- and 90-kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.* 155, 561–564. <https://doi.org/10.1093/infdis/155.3.561>
- Kleffmann, T., Schmidt, J., Schaub, G.A., 1998. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 548–555. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1998.tb05115.x>
- Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Steurer, F., Lawrence, G., Kubak, B., Radhakrishna, S., Leiby, D., Herron, R., Mone, T., Hunter, R., Kuehnert, M., Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team, 2009. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 48, 1534–1540. <https://doi.org/10.1086/598931>

- Leiby, D.A., Wendel, S., Takaoka, D.T., Fachini, R.M., Oliveira, L.C., Tibbals, M.A., 2000. Serologic Testing for *Trypanosoma cruzi*: Comparison of Radioimmunoprecipitation Assay with Commercially Available Indirect Immunofluorescence Assay, Indirect Hemagglutination Assay, and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits. *J. Clin. Microbiol.* 38, 639–642.
- Len, Ó., Pahissa, A., 2007. Infecciones transmitidas por el donante. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 25, 204–212. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(07\)74262-3](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(07)74262-3)
- Lent, H., Wygodzinsky, P.W., 1979. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the AMNH* ; v. 163, article 3. Triatominae.
- Leon, J.S., Engman, D.M., 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int. J. Parasitol.* 31, 555–561. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00163-1](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00163-1)
- Levenhagen, M.A., Costa-Cruz, J.M., 2014. Update on immunologic and molecular diagnosis of human strongyloidiasis. *Acta Trop.* 135, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.03.015>
- Levey, S., Jennings, E.R., 1950. The use of control charts in the clinical laboratory. *Am. J. Clin. Pathol.* 20, 1059–1066. https://doi.org/10.1093/ajcp/20.11_ts.1059
- Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J., Wallace, F.G., 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27, 37–58. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1980.tb04228.x>
- Lewis, M.D., Llewellyn, M.S., Yeo, M., Acosta, N., Gaunt, M.W., Miles, M.A., 2011. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1363. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001363>
- Lidani, K.C.F., Andrade, F.A., Bavia, L., Damasceno, F.S., Beltrame, M.H., Messias-Reason, I.J., Sandri, T.L., 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front. Public Health* 7. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>

- Llewellyn, M.S., Lewis, M.D., Acosta, N., Yeo, M., Carrasco, H.J., Segovia, M., Vargas, J., Torrico, F., Miles, M.A., Gaunt, M.W., 2009. *Trypanosoma cruzi* Ilc: Phylogenetic and Phylogeographic Insights from Sequence and Microsatellite Analysis and Potential Impact on Emergent Chagas Disease. PLoS Negl. Trop. Dis. 3, e510. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000510>
- López Eyzarguirre, N., 1999. Infectividad en ratón de las formas de *Trypanosoma cruzi* diferenciadas por primocultivo en medio LIT. Medula 44–8.
- Losada, S., Chacón, N., Colmenares, C., Bermúdez, H., Lorenzo, A., Pointier, J.P., Theron, A., Alarcón de Noya, B., Noya, O., 2005. *Schistosoma*: cross-reactivity and antigenic community among different species. Exp. Parasitol. 111, 182–190. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2005.07.007>
- Luquetti, A., Rassi, A., 2000. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, in: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. pp. 345–378.
- Luquetti, A.O., Tavares, S.B. do N., Siriano, L. da R., de Oliveira, R.A., Campos, D.E., de Moraes, C.A., de Oliveira, E.C., 2015. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 110, 369–376. <https://doi.org/10.1590/0074-02760140410>
- Ma, G., Holland, C.V., Wang, T., Hofmann, A., Fan, C.-K., Maizels, R.M., Hotez, P.J., Gasser, R.B., 2018. Human toxocariasis. Lancet Infect. Dis. 18, e14–e24. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30331-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30331-6)
- Machado-de-Assis, G.F., Diniz, G.A., Montoya, R.A., Dias, J.C.P., Coura, J.R., Machado-Coelho, G.L.L., Albajar-Viñas, P., Torres, R.M., Lana, M. de, 2013. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 873–880. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130122>
- Maghraby, A.S., Shaker, K.H., Gaber, H.M., 2009. Cross-reactivity of *Schistosoma mansoni*-*Fasciola gigantica* influenced by saponins. Z. Naturforschung C J. Biosci. 64, 288–296. <https://doi.org/10.1515/znc-2009-3-422>

- Magnaval, J.-F., Glickman, L.T., Dorchie, P., Morassin, B., 2001. Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.* 39, 1–11. <https://doi.org/10.3347/kjp.2001.39.1.1>
- Martínez-Pulgarín, D.F., Muñoz-Urbano, M., Gomez-Suta, L.D., Delgado, O.M., Rodríguez-Morales, A.J., 2015. Ocular toxocariasis: new diagnostic and therapeutic perspectives. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.* 10, 35–41. <https://doi.org/10.2174/1574891x10666150410125057>
- Medina-Lopes, M. das D., 1988. Transmissão do *Trypanosoma cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 21, 151–153. <https://doi.org/10.1590/S0037-86821988000300010>
- Messenger, L.A., Miles, M.A., 2015. Evidence and importance of genetic exchange among field populations of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop., Ecology and diversity of Trypanosoma cruzi* 151, 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.05.007>
- Miles, M.A., Cedillos, R.A., Póvoa, M.M., de Souza, A.A., Prata, A., Macedo, V., 1981. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet Lond. Engl.* 1, 1338–1340. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92518-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92518-6)
- Miles, M.A., Feliciangeli, M.D., de Arias, A.R., 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ* 326, 1444–1448. <https://doi.org/10.1136/bmj.326.7404.1444>
- Miller, W.G., Jones, G.R.D., Horowitz, G.L., Weykamp, C., 2011. Proficiency testing/external quality assessment: current challenges and future directions. *Clin. Chem.* 57, 1670–1680. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.168641>
- Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., Pou, D., Roure, S., Cabezós, J., Valerio, L., Blanco-Grau, A., Sánchez-Montalvá, A., Vidal, X., Pahissa, A., 2014. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 370, 1899–1908. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122>

- Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., 2017. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 23, 290–295. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.04.013>
- Mora Carpio, A.L., Meseeha, M., 2021. *Strongyloides Stercoralis*, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Morel, C.M., 1999. Chagas disease, from discovery to control - and beyond: history, myths and lessons to take home. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94, 03–16. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000700002>
- Morillo, C.A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., Del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., Mallagray, M., Apt, W., Beloscar, J., Gascon, J., Molina, I., Echeverria, L.E., Colombo, H., Perez-Molina, J.A., Wyss, F., Meeks, B., Bonilla, L.R., Gao, P., Wei, B., McCarthy, M., Yusuf, S., STOP-CHAGAS Investigators, 2017. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 939–947. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.12.023>
- Moscatelli, G., Moroni, S., García Bournissen, F., González, N., Ballering, G., Schijman, A., Corral, R., Bisio, M., Freilij, H., Altcheh, J., 2019. Longitudinal follow up of serological response in children treated for Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007668. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007668>
- Moser, D.R., Kirchhoff, L.V., Donelson, J.E., 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 27, 1477–1482. <https://doi.org/10.1128/JCM.27.7.1477-1482.1989>
- Mucci, J., Carmona, S.J., Volcovich, R., Altcheh, J., Bracamonte, E., Marco, J.D., Nielsen, M., Buscaglia, C.A., Agüero, F., 2017. Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005972>
- Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz, 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., Munoz-Davila, M.J., Thomas, M.C., López, M.C., Segovia, M., 2013. Risk Factors and Primary Prevention of Congenital Chagas Disease in a Nonendemic Country. *Clin. Infect. Dis.* 56, 496–502. <https://doi.org/10.1093/cid/cis910>
- Murcia, L., Carrilero, B., Segovia, M., 2012. Limitations of currently available Chagas disease chemotherapy. *Rev. Esp. Quimioter. Publ. Of. Soc. Esp. Quimioter.* 10, 1–3.
- Nagajyothi, F., Machado, F.S., Burleigh, B.A., Jelicks, L.A., Scherer, P.E., Mukherjee, S., Lisanti, M.P., Weiss, L.M., Garg, N.J., Tanowitz, H.B., 2012. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. *Cell. Microbiol.* 14, 634–643. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x>
- Navarro, M., Navaza, B., Guionnet, A., López-Vélez, R., 2012. Chagas Disease in Spain: Need for Further Public Health Measures. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1962. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001962>
- Norman, F.F., López-Vélez, R., 2013. Chagas Disease and Breast-feeding. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1561. <https://doi.org/10.3201/eid1910.130203>
- Nunes, M.C.P., Dones, W., Morillo, C.A., Encina, J.J., Ribeiro, A.L., Council on Chagas Disease of the Interamerican Society of Cardiology, 2013. Chagas disease: an overview of clinical and epidemiological aspects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 62, 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- OMS, 2015. Chagas disease in Latin America : an epidemiological update based on 2010 estimates = Maladie de Chagas en Amérique latine : le point épidémiologique basé sur les estimations de 2010. *Wkly. Epidemiol. Rec. Relevé Épidémiologique Hebd.*
- OMS, 2002. Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee, technical report series no 905'. Ginebra: WHO.
- OMS, 2005b. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. Geneva: Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control, Communicable Diseases Control, Prevention and Eradication, Communicable Diseases.

- Ortiz, S., Zulantay, I., Solari, A., Bisio, M., Schijman, A., Carlier, Y., Apt, W., 2012. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Trop.* 124, 243–246. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.001>
- Page, W.A., Dempsey, K., McCarthy, J.S., 2006. Utility of serological follow-up of chronic strongyloidiasis after anthelmintic chemotherapy. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 100, 1056–1062. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2005.12.006>
- PAHO, 2019. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. secondary guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease, 2019.
- PAHO, 2007. First session of the subcommittee on program, budget, and administration of the executive committee. Washington: Pan American Health Organization world health organization.
- PAHO, 1994. Manual of quality control procedures for serology laboratories of the blood banks. Washington, technical document PAHO/HPC/HCT 94.21.
- Pawlowski, Z., 2001. Toxocariasis in humans: clinical expression and treatment dilemma. *J. Helminthol.* 75, 299–305. <https://doi.org/10.1017/s0022149x01000464>
- Pearce, E.J., MacDonald, A.S., 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 499–511. <https://doi.org/10.1038/nri843>
- Pedreira De Freitas, J.L., Amato Neto, V., Sonntag, R., Biancalana, A., Nussenzevig, V., Barreto, J.G., 1952. [First tests on the accidental transmission of Chagas disease to man by blood transfusion]. *Rev. Paul. Med.* 40, 36–40.
- Peralta, J.M., Magalhães, T.C.R., Abreu, L., Manigot, D.A., Luquetti, A., Dias, J.C.P., 1981. The direct agglutination test for chronic Chagas's disease. The effect of pre-treatment of test samples with 2-mercaptoethanol. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75, 695–698. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(81\)90152-8](https://doi.org/10.1016/0035-9203(81)90152-8)
- Peralta, J.M., Teixeira, M.G., Shreffler, W.G., Pereira, J.B., Burns, J.M., Sleath, P.R., Reed, S.G., 1994. Serodiagnosis of Chagas' disease by enzyme-linked immunosorbent assay using two synthetic peptides as antigens. *J. Clin. Microbiol.* 32, 971–974.

- Pérez de Pedro, I., Martín Rico, P., Santamaría, S., Faez, I., Blanc, P., 2008. Caso clínico de Chagas trasfusional. *Emf Emerg* 10 (Supl 1), 14–18.
- 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. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 17, 1108–1113. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03423.x>
- Pérez-Molina, J.A., Molina, I., 2018. Chagas disease. *Lancet Lond. Engl.* 391, 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- Pinto, C.M., Ocaña-Mayorga, S., Tapia, E.E., Lobos, S.E., Zurita, A.P., Aguirre-Villacís, F., MacDonald, A., Villacís, A.G., Lima, L., Teixeira, M.M.G., Grijalva, M.J., Perkins, S.L., 2015. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *PLOS ONE* 10, e0139999. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139999>
- Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., Gascón, J., Gómez i Prat, J., 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>
- Pivetti-Pezzi, P., 2009. Ocular toxocariasis. *Int. J. Med. Sci.* 6, 129–130. <https://doi.org/10.7150/ijms.6.129>
- Plebani, M., Carraro, P., 1997. Mistakes in a stat laboratory: Types and frequency. *Clin. Chem.* 43, 1348–51. <https://doi.org/10.1093/clinchem/43.8.1348>
- Poulsen, C.S., Skov, S., Yoshida, A., Skallerup, P., Maruyama, H., Thamsborg, S.M., Nejsum, P., 2015. Differential serodiagnostics of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*-is it possible? *Parasite Immunol.* 37, 204–207. <https://doi.org/10.1111/pim.12181>
- Praast, G., Herzogenrath, J., Bernhardt, S., Christ, H., Sickinger, E., 2011. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 69, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.08.019>

- Prata, A., 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.* 1, 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Puerta-Alcalde, P., Gomez-Junyent, J., Requena-Mendez, A., Pinazo, M.J., Álvarez-Martínez, M.J., Rodríguez, N., Gascon, J., Muñoz, J., 2018. High prevalence of *S. Stercoralis* infection among patients with Chagas disease: A retrospective case-control study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006199. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006199>
- Puerto, R. del, Nishizawa, J.E., Kikuchi, M., Iihoshi, N., Roca, Y., Avilas, C., Gianella, A., Lora, J., Velarde, F.U.G., Renjel, L.A., Miura, S., Higo, H., Komiya, N., Maemura, K., Hirayama, K., 2010. Lineage Analysis of Circulating *Trypanosoma cruzi* Parasites and Their Association with Clinical Forms of Chagas Disease in Bolivia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000687>
- Qvarnstrom, Y., Schijman, A.G., Veron, V., Aznar, C., Steurer, F., da Silva, A.J., 2012. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6, e1689. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001689>
- Rabinovich, J.E., Wisnivesky-Colli, C., Solarz, N.D., Gürtler, R.E., 1990. Probability of transmission of Chagas disease by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) in an endemic area of Santiago del Estero, Argentina. *Bull. World Health Organ.* 68, 737–746.
- 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. JMD* 17, 605–615.
<https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>

Ramos, J.M., Pinargote, H., Andreu, M., Sastre, J., Torrus, D., Martinez-Escoriza, J.C., Portilla, J., 2014. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in Latin American pregnant women and level of compliance of the Valencian Health Programme in the city of Alicante. *Epidemiol. Infect.* 142, 888–890.
<https://doi.org/10.1017/S0950268813001921>

Rassi, A., Amato Neto, V., Rassi, G.G., Amato, V.S., Rassi Júnior, A., Luquetti, A.O., Rassi, S.G., 2004. [A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 37, 485–489. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822004000600011>

Rassi, A., Rassi, A., Marin-Neto, J.A., 2010. Chagas disease. *Lancet Lond. Engl.* 375, 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)

Rege, A.A., Wang, W., Dresden, M.H., 1992. Cysteine Proteinases from *Schistosoma haematobium* Adult Worms. *J. Parasitol.* 78, 16–23.
<https://doi.org/10.2307/3283679>

Requena-Méndez, A., Albajar-Viñas, P., Angheben, A., Chiodini, P., Gascón, J., Muñoz, J., 2014. Health Policies to Control Chagas Disease Transmission in European Countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3245.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003245>

Requena-Méndez, A., Chiodini, P., Bisoffi, Z., Buonfrate, D., Gotuzzo, E., Muñoz, J., 2013. The laboratory diagnosis and follow up of strongyloidiasis: a systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7, e2002.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002002>

Riarte, A., Luna, C., Sabatiello, R., Sinagra, A., Schiavelli, R., De Rissio, A., Maiolo, E., García, M.M., Jacob, N., Pattin, M., Lauricella, M., Segura, E.L., Vázquez, M., 1999. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 29, 561–567.
<https://doi.org/10.1086/598634>

Ribeiro, A.L., Sabino, E.C., Marcolino, M.S., Salemi, V.M.C., Ianni, B.M., Fernandes, F., Nastari, L., Antunes, A., Menezes, M., Oliveira, C.D.L., Sachdev, V., Carrick,

- D.M., Busch, M.P., Murphy, E.L., for the NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), I.C., 2013. Electrocardiographic Abnormalities in *Trypanosoma cruzi* Seropositive and Seronegative Former Blood Donors. PLoS Negl. Trop. Dis. 7, e2078. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002078>
- Ríos, J.F., Arboleda, M., Montoya, A.N., Alarcón, E.P., Parra-Henao, G.J., 2011. Probable outbreak of oral transmission of Chagas disease in Turbo, Antioquia. Biomédica 31, 185–95. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i2.302>
- 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>
- Roellig, D., Brown, E., Barnabé, C., Tibayrenc, M., Steurer, F., Yabsley, M., 2008. Molecular Typing of *Trypanosoma cruzi* Isolates, United States. Emerg. Infect. Dis. 14, 1123–5. <https://doi.org/10.3201/eid1407.080175>
- Roldán, W.H., Elefant, G.R., Ferreira, A.W., 2015. Deglycosylation of *Toxocara* excretory-secretory antigens improves the specificity of the serodiagnosis for human toxocariasis. Parasite Immunol. 37, 557–567. <https://doi.org/10.1111/pim.12248>
- Russomando, G., de Tomassone, M.M., de Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M.F., Figueredo, A., 1998. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 59, 487–491. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.487>
- Sabino, E.C., Ribeiro, A.L., Salemi, V.M.C., Di Lorenzo Oliveira, C., Antunes, A.P., Menezes, M.M., Ianni, B.M., Nastari, L., Fernandes, F., Patavino, G.M., Sachdev, V., Capuani, L., de Almeida-Neto, C., Carrick, D.M., Wright, D., Kavounis, K., Gonzalez, T.T., Carneiro-Proietti, A.B., Custer, B., Busch, M.P., Murphy, E.L., National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component, 2013. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. Circulation 127, 1105–1115. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.123612>

- Saez-Alquezar, A., Albajar-Viñas, P., Guimarães, A., Correa, J., 2015. Quality Control in Screening for Infectious Diseases at Blood Banks. Rationale and Methodology. *EJIFCC* 26, 278–85.
- Sáez-Alquezar, A., Junqueira, A.C.V., Durans, A. da M., Guimarães, A.V., Corrêa, J.A., Provance, D.W., Cabello, P.H., Coura, J.R., Viñas, P.A., 2020. Application of WHO International Biological Reference Standards to evaluate commercial serological tests for chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 115, e200214. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200214>
- Sáez-Alquézar, A., Otani, M.M., Sabino, E.C., Salles, N.A., Chamone, D.F., 2003. Programas de control externo de la calidad en serología desarrollados en América Latina con el apoyo de la OPS entre 1997 y 2000. *Rev. Panam. Salud Pública* 13, 91–102. <https://doi.org/10.1590/S1020-49892003000200009>
- Salas, N.A., Cot, M., Schneider, D., Mendoza, B., Santalla, J.A., Postigo, J., Chippaux, J.P., Brutus, L., 2007. Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. *Trop. Med. Int. Health* 12, 1498–1505. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01958.x>
- Saldaña, A., Samudio, F., Miranda, A., Herrera, L.M., Saavedra, S.P., Cáceres, L., Bayard, V., Calzada, J.E., 2005. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 729–731. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000700008>
- Salvador, F., Sulleiro, E., Sánchez-Montalvá, A., Martínez-Gallo, M., Carrillo, E., Molina, I., 2016. Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004663. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004663>
- Salvador, Fernando, Sulleiro, E., Sánchez-Montalvá, A., Saugar, J.M., Rodríguez, E., Pahissa, A., Molina, I., 2014. Usefulness of *Strongyloides stercoralis* serology in the management of patients with eosinophilia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 830–834. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0678>
- 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. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 20, 706–712. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12443>

Sánchez, B., Monteón, V., Reyes, P.A., Espinoza, B., 2001a. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. Arch. Med. Res. 32, 382–388. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00303-4)

Sánchez, B., Monteón, V., Reyes, P.A., Espinoza, B., 2001b. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. Arch. Med. Res. 32, 382–388. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00303-4](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00303-4)

Sánchez-Camargo, C.L., Albajar-Viñas, P., Wilkins, P.P., Nieto, J., Leiby, D.A., Paris, L., Scollo, K., Flórez, C., Guzmán-Bracho, C., Luquetti, A.O., Calvo, N., Tadokoro, K., Saez-Alquezar, A., Palma, P.P., Martin, M., Flevaud, L., 2014. Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting *Trypanosoma cruzi* Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. J. Clin. Microbiol. 52, 2506–2512. <https://doi.org/10.1128/JCM.00144-14>

Santana, K.H., Oliveira, L.G.R., Barros de Castro, D., Pereira, M., 2020. Epidemiology of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. Trop. Med. Int. Health TM IH 25, 752–763. <https://doi.org/10.1111/tmi.13398>

Schär, F., Trostorf, U., Giardina, F., Khieu, V., Muth, S., Marti, H., Vounatsou, P., Odermatt, P., 2013. *Strongyloides stercoralis*: Global Distribution and Risk Factors. PLoS Negl. Trop. Dis. 7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002288>

Schijman, A.G., Alonso-Padilla, J., Longhi, S.A., Picado, A., 2022. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 117, e200444. <https://doi.org/10.1590/0074-02760200444>

Schijman, A.G., Altcheh, J., Burgos, J.M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M.J., Freilij, H., 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., Deborggraeve, S., Hajar, G., Zulantay, I., Lucero, R.H., Velazquez, E., Tellez, T., Sanchez Leon, Z., Galvão, L., Nolder, D., Monje Rumi, M., Levi, J.E., Ramirez, J.D., Zorrilla, P., Flores, M., Jercic, M.I., Crisante, G., Añez, N., De Castro, A.M., Gonzalez, C.I., Acosta Viana, K., Yachelini, P., Torrico, F., Robello, C., Diosque, P., Triana Chavez, O., Aznar, C., Russomando, G., Büscher, P., Assal, A., Guhl, F., Sosa Estani, S., DaSilva, A., Britto, C., Luquetti, A., Ladzins, J., 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931>

Schmatz, D.M., Murray, P.K., 1981. *Trypanosoma cruzi*: selective isolation of pure trypomastigotes from cultured muscle cells. *J. Parasitol.* 67, 517–521.

Schmunis, G., Zaida, Y., 2009. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>

Schmunis, Gabriel A., 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102 Suppl 1, 75–85. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762007005000093>

Schmunis, G. A., 2007. The globalization of Chagas disease. *ISBT Sci. Ser.* 2, 6–11. <https://doi.org/10.1111/j.1751-2824.2007.00052.x>

Schmunis, G.A., 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 93–101. <https://doi.org/10.1590/s0074-02761999000700010>

Schmunis, G.A., Yadon, Z.E., 2010. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop.* 115, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.11.003>

- Schofield, C.J., Galvão, C., 2009. Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop* 110: 88-100. *Acta Trop.* 110, 88–100. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.01.010>
- Sguassero, Y., Roberts, K.N., Harvey, G.B., Comandé, D., Ciapponi, A., Cuesta, C.B., Aguiar, C., Castro, A.M. de, Danesi, E., de Andrade, A.L., de Lana, M., Escribà, J.M., Fabbro, D.L., Fernandes, C.D., Flores-Chávez, M., Hasslocher-Moreno, A.M., Jackson, Y., Lacunza, C.D., Machado-de-Assis, G.F., Maldonado, M., Meira, W.S.F., Molina, I., Monje-Rumi, M.M., Muñoz-San Martín, C., Murcia, L., Nery de Castro, C., Sánchez Negrette, O., Segovia, M., Silveira, C.A.N., Solari, A., Steindel, M., Streiger, M.L., Vera de Bilbao, N., Zulantay, I., Sosa-Estani, S., 2018. Course of serological tests in treated subjects with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: A systematic review and meta-analysis of individual participant data. *Int. J. Infect. Dis.* 73, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.05.019>
- Shikanai-Yasuda, M.A., Carvalho, N.B., 2012. Oral transmission of Chagas disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 54, 845–852. <https://doi.org/10.1093/cid/cir956>
- Silva-Moraes, V., Shollenberger, L.M., Siqueira, L.M.V., Castro-Borges, W., Harn, D.A., Grenfell, R.F.Q. e, Rabello, A.L.T., Coelho, P.M.Z., 2019. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 114, e180478. <https://doi.org/10.1590/0074-02760180478>
- Simón, M., Gil-Gallardo, L.J., Asunción Iborra, M., Carrilero, B., López, M.C., Romay-Barja, M., Murcia, L., Carmen Thomas, M., Benito, A., Segovia, M., 2019. An observational longitudinal study to evaluate tools and strategies available for the diagnosis of Congenital Chagas Disease in a non-endemic country. *Acta Trop.* 199, 105127. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105127>
- Smith, H., Holland, C., Taylor, M., Magnaval, J.-F., Schantz, P., Maizels, R., 2009. How common is human toxocariasis? Towards standardizing our knowledge. *Trends Parasitol.* 25, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2009.01.006>
- Smith, H., Noordin, R., 2006. Diagnostic limitations and future trends in the serodiagnosis of human toxocariasis., in: Holland, C.V., Smith, H.V. (Eds.),

Toxocara: The Enigmatic Parasite. CABI, Wallingford, pp. 89–112.
<https://doi.org/10.1079/9781845930264.0089>

Smith, M.A., Clegg, J.A., Webbe, G., 1976. Cross-immunity to *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* in the hamster. *Parasitology* 73, 53–64.
<https://doi.org/10.1017/s0031182000051325>

Sosa Estani, S., Segura, E.L., Ruiz, A.M., Velazquez, E., Porcel, B.M., Yampotis, C., 1998. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 526–529.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.526>

Sosa-Estani, S., Colantonio, L., Segura, E.L., 2012. Therapy of chagas disease: implications for levels of prevention. *J. Trop. Med.* 2012, 292138.
<https://doi.org/10.1155/2012/292138>

Souto, R.P., Fernandes, O., Macedo, A.M., Campbell, D.A., Zingales, B., 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 83, 141–152. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(96\)02755-7](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(96)02755-7)

Souza, F.F., Castro-E-Silva, O., Marin Neto, J.A., Sankarankutty, A.K., Teixeira, A.C., Martinelli, A.L.C., Gaspar, G.G., Melo, L., Figueiredo, J.F.C., Romano, M.M.D., Maciel, B.C., Passos, A.D.C., Rossi, M.A., 2008. Acute chagasic myocardopathy after orthotopic liver transplantation with donor and recipient serologically negative for *Trypanosoma cruzi*: a case report. *Transplant. Proc.* 40, 875–878.
<https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2008.02.032>

Soy, D., Aldasoro, E., Guerrero, L., Posada, E., Serret, N., Mejía, T., Urbina, J.A., Gascón, J., 2015. Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 3342–3349.
<https://doi.org/10.1128/AAC.05018-14>

Strout, R.G., 1962. A method for concentrating hemoflagellates. *J. Parasitol.* 48, 100.

Taylor, M.R., Keane, C.T., O'Connor, P., Mulvihill, E., Holland, C., 1988. The expanded spectrum of *Toxocara* disease. *Lancet Lond. Engl.* 1, 692–695.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(88\)91486-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(88)91486-9)

- Teixeira, A.R.L., Hecht, M.M., Guimaro, M.C., Sousa, A.O., Nitz, N., 2011. Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>
- ten Hove, R.J., Verweij, J.J., Vereecken, K., Polman, K., Dieye, L., van Lieshout, L., 2008. Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* infection in stool samples collected in northern Senegal. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2007.10.011>
- Torrico, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M.-C., Dramaix, M., Truyens, C., Carlier, Y., 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70, 201–209.
- Toso M, A., Vial U, F., Galanti, N., 2011. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Rev. Médica Chile* 139, 258–266. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872011000200017>
- Traina, M.I., Hernandez, S., Sanchez, D.R., Dufani, J., Salih, M., Abuhamidah, A.M., Olmedo, W., Bradfield, J.S., Forsyth, C.J., Meymandi, S.K., 2017. Prevalence of Chagas Disease in a U.S. Population of Latin American Immigrants with Conduction Abnormalities on Electrocardiogram. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11, e0005244. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005244>
- Tsang, V.C., Wilkins, P.P., 1997. Immunodiagnosis of schistosomiasis. *Immunol. Invest.* 26, 175–188. <https://doi.org/10.3109/08820139709048925>
- Tyler, K.M., Engman, D.M., 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int. J. Parasitol.*, The Third Internet Conference on Salivarian Trypanosomes and *Trypanosomatids* 31, 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Umezawa, E.S., Bastos, S.F., Camargo, M.E., Yamauchi, L.M., Santos, M.R., Gonzalez, A., Zingales, B., Levin, M.J., Sousa, O., Rangel-Aldao, R., da Silveira, J.F., 1999. Evaluation of Recombinant Antigens for Serodiagnosis of Chagas' Disease in South and Central America. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1554–1560.

- Uparanukraw, P., Phongsri, S., Morakote, N., 1999. Fluctuations of larval excretion in *Strongyloides stercoralis* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 60, 967–973. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1999.60.967>
- Vazquez-Prokopec, G.M., Spillmann, C., Zaidenberg, M., Kitron, U., Gürtler, R.E., 2009. Cost-Effectiveness of Chagas Disease Vector Control Strategies in Northwestern Argentina. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3, e363. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000363>
- Villar, J.C., Perez, J.G., Cortes, O.L., Riarte, A., Pepper, M., Marin-Neto, J.A., Guyatt, G.H., 2014. Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2014. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003463.pub2>
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M.G., Postan, M., Armenti, A., 2006. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann. Intern. Med.* 144, 724–734. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-10-200605160-00006>
- Virreira, M., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Brutus, L., Jijena, J., Torrico, F., Carlier, Y., Svoboda, M., 2007. Comparison of *Trypanosoma cruzi* Lineages and Levels of Parasitic DNA in Infected Mothers and Their Newborns. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 102–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.77.102>
- Volta, B.J., Perrone, A.E., Rivero, R., Scollo, K., Bustos, P.L., Bua, J., 2018. Some Limitations for Early Diagnosis of Congenital Chagas Infection by PCR. *Pediatrics* 141, S451–S455. <https://doi.org/10.1542/peds.2016-3719>
- Wendel, S., 1998. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr. Opin. Hematol.* 5, 406–411. <https://doi.org/10.1097/00062752-199811000-00009>
- Westgard, J.O., Barry, P.L., Hunt, M.R., Groth, T., 1981. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. *Clin. Chem.* 27, 493–501.
- WHO, 2002. Control of Chagas disease. Geneva; WHO Technical Report Series 905. World health Organization, Geneva.

- Wincker, P., Britto, C., Pereira, J.B., Cardoso, M.A., Oelemann, W., Morel, C.M., 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51, 771–777. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.51.771>
- Wiśniewska-Ligier, M., Woźniakowska-Gęsicka, T., Sobolewska-Dryjańska, J., Markiewicz-Józwiak, A., Wieczorek, M., 2012. Analysis of the course and treatment of toxocariasis in children-a long-term observation. *Parasitol. Res.* 110, 2363–2371. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2772-y>
- Won, K.Y., Kruszon-Moran, D., Schantz, P.M., Jones, J.L., 2008. National seroprevalence and risk factors for Zoonotic *Toxocara* spp. infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 552–557.
- Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R.S., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G., 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 1051–1054. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>
- Zingales, B., Bartholomeu, D.C., 2022. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 117, e210193. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>
- 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. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 12, 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>