



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Factores de Riesgo y Prevención Primaria de
la Enfermedad de Chagas Congénita**

D^a Marina Simón Páez

2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Factores de riesgo y prevención primaria de la enfermedad de Chagas congénita.

Memoria presentada para optar al grado de doctor por
D^a Marina Simón Páez

Dirigida por el Doctor Manuel Segovia Hernández y la
Doctora Laura Murcia Flores

Murcia 2017

A mi abuelo Joaquín Páez Lorente, *in memoriam*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar agradecer a mis directores de tesis, Dr. Manuel Segovia Hernández y a la Dra. Laura Murcia, por hacerme partícipe de este proyecto. Por su apoyo, su dedicación durante estos años, por adentrarme en el mundo de la investigación y transmitirme su entusiasmo por la Medicina Tropical.

Agradecer a todas aquellas personas que forman o han formado parte de la Unidad de Medicina Tropical (Dra. M^a Asunción Iborra, Dra. Maricarmen Martínez, Dra. María José Muñoz, Mercedes Roig, Francisco Ferrer, Cristina Vázquez, Luis Gil-Gallardo, Lina). Y especialmente, al Dr. Bartolomé Carrilero y la enfermera Fuensanta Franco, ya que, sin su labor diaria en la atención al paciente con enfermedad de Chagas, este proyecto no hubiera sido posible.

Al Dr. Tomás Rodríguez y a las técnicas del servicio de serología del HCUVA, por su actividad asistencial en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Al Dr. Manuel Carlos López y a la Dra. M^a Carmen Thomas del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC, Granada), por su aportación a la presente tesis doctoral en el cultivo y la tipificación de las cepas de *T. cruzi*.

Al Dr. Alfredo Minguela y la Dra. Lourdes Gimeno del servicio de inmunología del HCUVA, por la ayuda prestada para la realización de la técnica de PCR cuantitativa.

A Guadalupe Ruiz, estadística de la Fundación para la Formación e Investigación Sanitarias de la Región de Murcia, por su contribución en el análisis estadístico de la presente Tesis Doctoral.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación, a la Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET RD12/0018/0018) del Instituto de Salud Carlos III, por su ayuda económica en la realización de la fase experimental.

Y a todo el personal facultativo, técnicos y residentes del servicio de Microbiología del HCUVA, por el apoyo y confianza depositada en mí durante todos estos años, porque me han hecho crecer como profesional y sobre todo como persona, convirtiéndose en estos años en una segunda familia a mí.

Y como no, a mi familia, por apoyarme y animarme en todos los proyectos que he emprendido. Agradecer los valores que me han inculcado, a ellos les debo el haberme convertido en la persona que soy hoy en día. Sus palabras de motivación y su confianza en mí me han permitido alcanzar todos aquellos objetivos que me he ido planteando hasta el día de hoy, muchas gracias por estar siempre ahí.

A Adrián, por su apoyo incondicional, su comprensión y ánimos en todo momento. Por celebrar mis logros como propios, no me imagino un mejor compañero de viaje.

RESUMEN

Introducción/objetivos: La migración de mujeres infectadas por *T. cruzi*, principalmente a Norteamérica y Europa, hacen que la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas sea un problema de salud pública a nivel mundial. En este estudio realizado fuera de área endémica, se evalúa la efectividad del tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida para prevenir la enfermedad de Chagas congénita; así como, la utilidad de la PCR como herramienta para predecir el riesgo de transmisión de la infección, realizar el diagnóstico precoz y el seguimiento post-tratamiento de los niños infectados. Además, se abordó el estudio de la lactancia materna como posible vía de transmisión de la infección ya que ésta vía ha sido propuesta como una ruta alternativa de transmisión de *T. cruzi* aunque no ha sido confirmada.

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio de cohortes longitudinal en 144 mujeres embarazadas seropositivas en fase crónica de la enfermedad de Chagas y sus 160 niños, los cuales fueron atendidos en a la Unidad de Medicina Tropical (UMT) del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca en Murcia, desde enero de 2007 hasta mayo de 2016. Se estudió el estado parasitológico mediante PCR en 159 embarazos, 38 de ellos correspondían a madres que previamente habían sido tratadas. En los 160 niños (incluido una pareja de gemelos) se realizó un estudio mediante PCR (en sangre periférica) y serología a los 0-6, 9 y 12 meses, y anualmente después del tratamiento. Se realizó la PCR cuantitativa en dos grupos de mujeres seropositivas para estudiar la carga parasitaria: 9 madres que dieron a luz niños infectados y 10 madres que dieron a luz niños sanos. También se analizó mediante PCR las muestras de leche de 50 madres para evaluar el riesgo de transmisión a través de la lactancia. Además, un total de 46 muestras de sangre de cordón, 33 muestras de placenta y 33 muestras de cordón umbilical fueron analizadas mediante PCR para evaluar cuál es la muestra más adecuada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

Resultados: Dieciséis niños fueron diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita, esto supone una tasa de transmisión del 10% entre las madres seropositivas (16 niños infectados de 160 nacimientos). La PCR mostró ser una técnica útil para predecir el riesgo de transmisión congénita, el 18,8% de las madres con resultado de PCR positivo

transmitió la infección (16 niños infectados de 85 embarazos). Mientras que, ningún niño resultó infectado en los 74 embarazos de madres con resultado de PCR negativo [VPN: 100%]. Además, la carga parasitaria determinada mediante PCR cuantitativa fue mayor en las madres de los niños infectados, respecto a las madres de los niños no infectados ($p=0.008$). Respecto al tratamiento de las mujeres en edad fértil, el 92,1% de las madres tratadas tuvieron un resultado de PCR negativo, comparado con el 32,2% de las madres no tratadas. Además, no se detectó ningún niño infectado entre las madres previamente tratadas, comparado con el 13,5% de las madres no tratadas ($p = 0.019$). La PCR demostró tener una excelente sensibilidad en el diagnóstico de los niños infectados (100%), siendo la muestra de sangre periférica la más adecuada para el diagnóstico. Los niños que fueron diagnosticados mediante PCR y tratados antes del año de vida presentaron resultados de PCR y serología negativos y por tanto se consideró que estaban curados. En cambio, en aquellos en los que el diagnóstico se realizó con más de un año la serología continua siendo positiva por lo que aún no se ha logrado confirmar la cura de la infección. Tras el tratamiento de los casos congénitos, los resultados de PCR fueron negativos en todos los niños y en once de ellos se mantuvo así durante el seguimiento. Sin embargo, en dos casos los resultados de PCR volvieron a ser positivos permitiendo detectar el fracaso terapéutico. En el estudio de la transmisión del parásito al recién nacido mediante la lactancia, únicamente se detectó la presencia de ADN de *T. cruzi* mediante PCR en una muestra de leche de una madre con parasitemia detectable mediante PCR que no transmitió la infección a su hijo, a pesar de haber amamantado al bebe.

Conclusiones: La parasitemia materna ésta directamente relacionada con el riesgo de infección neonatal. El tratamiento de las mujeres en edad fértil previene la enfermedad de Chagas congénita al reducir la parasitemia en la madre. La PCR es una herramienta fundamental en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita. La transmisión de *T. cruzi* a través de la lactancia materna en las mujeres crónicamente infectadas es poco probable, por lo tanto no se recomienda la interrupción de la lactancia materna.

SUMMARY

Background: The migration of *T. cruzi*-infected women, mainly to North America and Europe, has made the congenital transmission of Chagas disease a worldwide public health problem. In this study, in a non-endemic area, we evaluate the effectiveness of treating women of childbearing age to prevent congenital Chagas disease, as well as the usefulness of PCR as a tool to predict the risk of transmission, to make an early diagnosis and to follow-up infected infants post-treatment. In addition, we approach the problem of breast feeding, since breast-feeding has been proposed as an alternative route of *T. cruzi* transmission, although not confirmed.

Methods: This longitudinal cohort study was carried out in 144 seropositive pregnant women with chronic Chagas disease and their 160 offspring, who attended the Unit of Tropical Medicine (UTM) of the Hospital Virgen de la Arrixaca in Murcia, from January 2007 through May 2016. The parasitological status was studied by PCR of 159 pregnancies, 38 of which involved previously treated mothers. 160 children (including a pair of twins) were examined by PCR and serologically studied at 0-6, 9 and 12 months and annually after treatment. Parasite load was evaluated by quantitative PCR in two groups of seropositive women: 9 mothers of infected infants and 10 mothers of healthy infants. We also used PCR to analyse milk samples from 50 mothers to evaluate the risk of transmission through breast-feeding. Moreover, a total of 46 cord blood samples, 33 placental samples and 33 umbilical tissue samples were analysed by PCR to evaluate which it best for the diagnosis of congenital Chagas disease.

Results: Sixteen infants were diagnosed with congenital Chagas disease. This represents a transmission rate of 10% among seropositive mothers (16 infected newborns in 160 total live births). PCR was seen to be useful for predicting the risk of congenital transmission: 18.8% of mothers with a positive PCR result transmitted the infection (16 infected children out of 85 pregnancies). No infected infants were detected among 74 pregnancies when PCR was negative [NPV: 100%]. Parasite loads, as determined by quantitative PCR, were higher for mothers of infected infants than for seropositive mothers of uninfected infants ($p=0.008$). Regarding the treatment of

women in fertile age, 92.1% of the treated mothers, had negative PCR results, compared with 32.2% of untreated mothers. Furthermore, no infected infants were detected from previously treated mothers, compared with 13.2% among untreated mothers ($p = 0.019$). PCR showed excellent sensitivity (100%) in the diagnosis of 16 infected infants. Peripheral blood proved to be the most suitable sample for the diagnosis of CCD by PCR. Infants diagnosed by PCR and treated before the first year of life were cured, with negative PCR and serology results. This is in contrast to those who were diagnosed at an older age, whose serology remained positive and who were not cured. PCR became negative for all the treated infants and in 11 cases it remained negative until the end of the follow-up. However, PCR shifted to positive in two cases, pointing to therapeutic failure. In the study of breast-feeding as a possible route of parasite transmission, we only detected the presence of *T. cruzi* DNA in the milk sample of one mother with a parasitemia detectable by PCR. However, she did not transmit the parasite to her baby, despite breastfeeding the newborn.

Conclusions: The maternal parasitemia is directly related to the risk of neonatal infection. Treating infected women of childbearing age prevents congenital Chagas disease by reducing the parasitemia in the mother. PCR is a very useful tool in the congenital Chagas disease diagnostic algorithm. It is highly improbable that *T. cruzi* is transmitted through breast-feeding by mothers with chronic Chagas disease, and consequently discontinuing breast-feeding should not be recommended.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Etiología de la enfermedad de Chagas	5
1.1. Ciclo biológico	5
1.2. Vías de transmisión	7
1.2.1. Transmisión vectorial	8
1.2.2. Transmisión congénita	10
1.2.3. Transmisión transfusional	12
1.2.4. Transmisión por donación de órganos	13
1.2.5. Transmisión oral	13
1.2.6. Transmisión por accidente de laboratorio	14
2. Epidemiología	14
2.1. Zona endémica	15
2.2. Zona no endémica.....	17
2.3. Chagas congénito	19
2.4. Epidemiología molecular	20
3. Patogenia de la enfermedad de Chagas.....	22
3.1. Fases de la enfermedad de Chagas.....	23
3.1.1. Fase aguda.....	24
3.1.2. Fase crónica	24
3.2. Manifestaciones de la enfermedad de Chagas	25
3.2.1. Cardíaca.....	25
3.2.2. Digestiva.....	25
3.2.3. Congénita.....	26
4. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas	28
4.1. Diagnóstico parasitológico	28
4.2. Diagnóstico molecular	29

Factores de riesgo y prevención primaria de la enfermedad de Chagas congénita

4.3. Diagnóstico serológico.....	31
4.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita	32
5. Cribado.....	34
6. Tratamiento.....	36
7. Control y prevención	39
II. OBJETIVOS.....	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
1. Muestras clínicas	49
2. Técnicas parasitológicas: microhematocrito	50
3. Técnicas serológicas.....	51
3.1. Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	51
3.2. Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)	52
4. Técnicas moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	53
4.1. Extracción del ADN	53
4.2. Amplificación de ADN mediante PCR cualitativa.....	54
4.3. Técnicas electroforéticas.....	55
4.4. Amplificación de ADN por PCR cuantitativa.....	55
5. Tratamiento.....	57
6. Población a estudio	58
6.1. Mujeres embarazadas o en edad fértil de origen latinoamericano	58
6.2. Niños de madres latinoamericanas con serología <i>T. cruzi</i> positiva	59
6.3. Cohorte general	60
6.4. Grupo 1.....	65
6.5. Grupo 2.....	68
6.6. Grupo 3.....	69
6.7. Grupo 4.....	71
6.8. Grupo 5.....	73

6.9. Grupo 6.....	75
7. Análisis estadístico.....	78
8. Consideraciones éticas.....	79
IV. RESULTADOS	81
1. Factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.....	83
1.1. Factores epidemiológicos.....	83
1.1.1. País y región de origen	83
1.1.2. Edad.....	84
1.1.3. Años en España.....	85
1.2. Parasitemia en las madres detectada mediante PCR de <i>T. cruzi</i>	87
1.2.1. Estado parasitológico de las madres durante el embarazo	87
1.2.2. Valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical.....	88
1.2.3. Cuantificación de la carga parasitaria	89
2. Tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida de prevención primaria de la transmisión vertical de <i>T. cruzi</i>	94
3. Estudio de la lactancia materna como posible vía de transmisión de <i>T. cruzi</i> al recién nacido	101
3.1. Análisis parasitológico de las muestras de sangre de las madres	101
3.2. Análisis parasitológico de las muestras de leche	102
3.3. Diagnóstico de los recién nacidos infectados	103
4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita	104
4.1. Sensibilidad, especificidad y rapidez diagnóstica de las técnicas empleadas.....	105
4.2. Muestras empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita mediante PCR	110
5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.....	113
5.1. Abortos espontáneos	113
5.2. Enfermedad de Chagas congénita sintomática o asintomática.....	115

6. Tratamiento de los niños con enfermedad de Chagas congénita: seguimiento serológico y por PCR post-tratamiento.....	117
V. DISCUSIÓN	123
1. Factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.....	126
1.1. Factores epidemiológicos: País y región de origen, edad y años de residencia en España	127
1.2. Parasitemia detectada mediante PCR de <i>T. cruzi</i> en las madres.....	128
1.2.1. Estado parasitológico de las madres durante el embarazo	128
1.2.2. Valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical.....	128
1.2.3. Cuantificación de la carga parasitaria	132
2. Tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida de prevención primaria de la transmisión vertical de <i>T. cruzi</i>.....	133
3. Estudio de la lactancia materna como posible vía de transmisión de <i>T. cruzi</i> al recién nacido	137
4. Técnicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita	140
5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita.....	146
6. Tratamiento de los niños con enfermedad de Chagas congénita: seguimiento serológico y por PCR post-tratamiento.....	148
VI. CONCLUSIONES.....	153
VII. BIBLIOGRAFÍA	157

I. INTRODUCCIÓN

1. Introducción

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, ésta causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, protozoo hemoflagelado perteneciente al orden de los *Kinetoplastida* (Dorn *et al.*, 2007). Se transmite a los seres humanos principalmente por las heces de insectos triatomíneos que actúan como vectores, conocidos como vinchucas, chinches o con otros nombres, según la zona geográfica. Esta enfermedad es endémica de los países del continente americano comprendidos entre México y el sur de Argentina y Chile, presentando unos elevados índices de mortalidad y morbilidad (OMS, 2015).

Su nombre hace referencia al médico e infectólogo brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (figura I.1), quién en 1909 la describió por primera vez en el pueblo de Lassance en Brasil (Kropf, 2011). No solo descubrió el agente que producía la enfermedad sino que describió además, los mecanismos involucrados en su ciclo biológico, hizo las primeras inferencias epidemiológicas de la enfermedad y constató la parasitosis humana por primera vez (Chagas, 1909).



Figura I.1. Dr. Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas en su laboratorio en el Instituto de Seroterapia Federal en Manguinhos, Rio de Janeiro. Fuente: Organización Mundial de la Salud (OMS). Disponible en: www.who.int/bulletin/volumes/87/7/09-030709/es/

Esta enfermedad es considerada como uno de los mayores problemas de salud pública y de extrema gravedad en América Latina. Presenta una firme vinculación con aspectos socio-económico-culturales deficitarios (Mathers *et al.*, 2007), siendo reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales enfermedades desatendidas (Hotez *et al.*, 2007).

La OMS estima que en el mundo puede haber entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*, la mayoría en países de América Latina, donde el parásito es endémico; y más de 25 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad. La mortalidad asociada a esta enfermedad es de al menos 10.000 muertes al año (OMS, 2015). Con la implantación de diferentes estrategias para disminuir la transmisión vectorial en áreas endémicas y la introducción del cribado universal en donantes de sangre y órganos, ésta aumentando la importancia epidemiológica de la transmisión vertical de *T. cruzi* (Norman y López-Vélez, 2013).

Tradicionalmente la enfermedad de Chagas ha afectado a países de América latina, pero en los últimos 50 años, debido fundamentalmente a los movimientos migratorios; la distribución de la enfermedad de Chagas está cambiando, extendiéndose a países no endémicos de América y otras zonas del mundo (Albajar-Vinas y Jannin, 2011).

Se estima que cada año nacerán unos 8668 recién nacidos infectados. Este hecho asociado a la migración de mujeres infectadas por *T. cruzi*, principalmente a Norteamérica y Europa, hacen que transmisión congénita de Chagas sea un problema de salud pública a nivel mundial (Carlier *et al.*, 2015). La 66ª Asamblea Mundial de la Salud de la OMS celebrada en 2013 en Ginebra (Suiza) destaca la necesidad de abordar esta vía de transmisión, incluyendo el cribado de las mujeres latinoamericanas embarazadas como una medida importante que se debe adoptar para la prevención y control de la enfermedad de Chagas, especialmente en los países no endémicos dónde constituye la principal vía de transmisión de la enfermedad.

1. Etiología de la enfermedad de Chagas

T. cruzi es un protozoo flagelado de la familia *Trypanosomatidae*, orden Kinetoplastida y género *Trypanosoma* (Brenner, 1973). Este género está constituido por cerca de 20 especies, de las cuales solo tres infectan al ser humano y dos de ellas son patógenas: *T. cruzi*, agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana, y *T. brucei*, agente etiológico de la enfermedad del sueño o Tripanosomiasis africana.

T. cruzi presenta tres fases morfológicas: epimastigote, amastigote y tripomastigote. Según su fase de desarrollo en el vector, *T. cruzi* se clasifica dentro del grupo *Stercoraria*; ya que la multiplicación en el huésped mamífero tiene lugar en la fase de amastigote de manera discontinua y en el vector el desarrollo se completa en el intestino posterior, transmitiendo la enfermedad a través de las heces (Kirchhoff, 2006).

1.1. Ciclo biológico

El parásito *T. cruzi* tiene un ciclo biológico complejo, siendo un organismo digenético con alternancia entre un hospedador vertebrado y un insecto vector, cambiando su morfología y expresión antigénica de acuerdo a su estadio y lugar donde se encuentra.

El parásito presenta tres morfologías funcionales distintas (Brenner, 1973), caracterizadas según: el curso intracelular, el nacimiento del flagelo y el punto donde emerge libre. Además, se tiene en cuenta la posición del kinetoplasto con relación al núcleo celular (Braun y de Titto, 1985).

En el hospedador vertebrado, *T. cruzi* se encuentra en dos formas: los tripomastigotes extracelulares en la sangre y los amastigotes intracelulares en los tejidos. En el vector también existen dos formas, ambas extracelulares: los epimastigotes en el intestino y los tripanosomas metacíclicos en el intestino terminal.

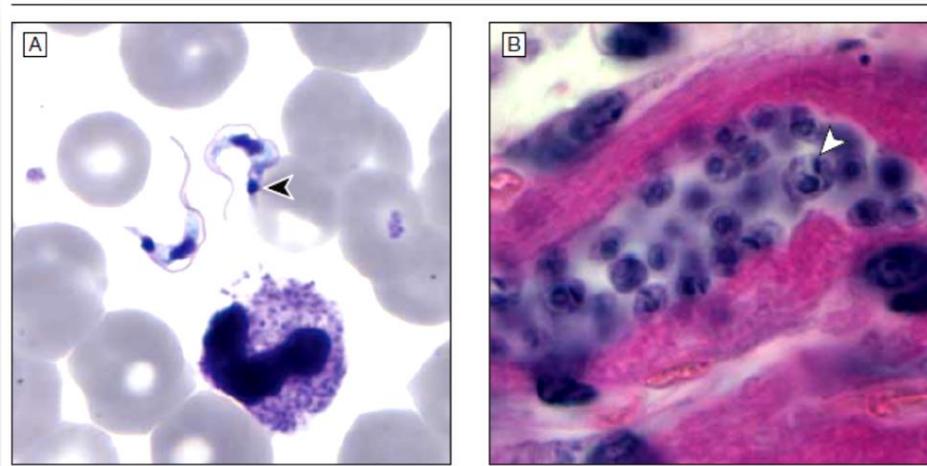


Figura I.2. A) Se observa la forma de tripomastigote de *T. cruzi* en un frotis sanguíneo de un paciente en fase aguda de la enfermedad de Chagas. La flecha señala el kinetoplasto (tinción Giemsa, objetivo x 100). B) Se observan las formas amastigotas de *T. cruzi* en los monocitos cardíacos de un paciente en fase crónica de la enfermedad de Chagas. La flecha señala el kinetoplastido (tinción hematosilina-eosina, objetivo x 100). Fuente: Courtesy of the Division of Parasitic Diseases, US Centers for Disease Control and Prevention.

El ciclo se inicia cuando el insecto vector ingiere tripomastigotes circulantes al alimentarse de la sangre de un hospedador mamífero infectado. En el interior del aparato digestivo del vector los tripomastigotes se transforman en epimastigotes, los cuales se replican en el intestino medio del hospedador invertebrado, diferenciándose a tripomastigotes meta-cíclicos, capaces de infectar al hospedador vertebrado. Tras la picadura, el parásito se libera en las heces del vector. Los tripomastigotes meta-cíclicos penetran a través de la mucosa intacta del hospedador mamífero o bien mediante la herida provocada por el rascado tras la picadura del insecto. Una vez en el torrente sanguíneo del vertebrado, los tripomastigotes son capaces de penetrar en una gran variedad de tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, células del sistema nervioso y musculares) (Burleigh y Andrews, 1995). Dentro de las células, los parásitos se transforman en formas amastigotes, los cuales sufren varios ciclos de división. Seguidamente, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que son liberados por ruptura de la célula anfitriona, iniciando el siguiente ciclo de infección (figura I.3).

Los huéspedes definitivos son, además del ser humano, animales vertebrados domésticos (perros y gatos) y silvestres (armadillos, zarigüeyas, murciélagos y ratas comunes), los cuales además de por la picadura pueden infectarse alimentándose de estos insectos.

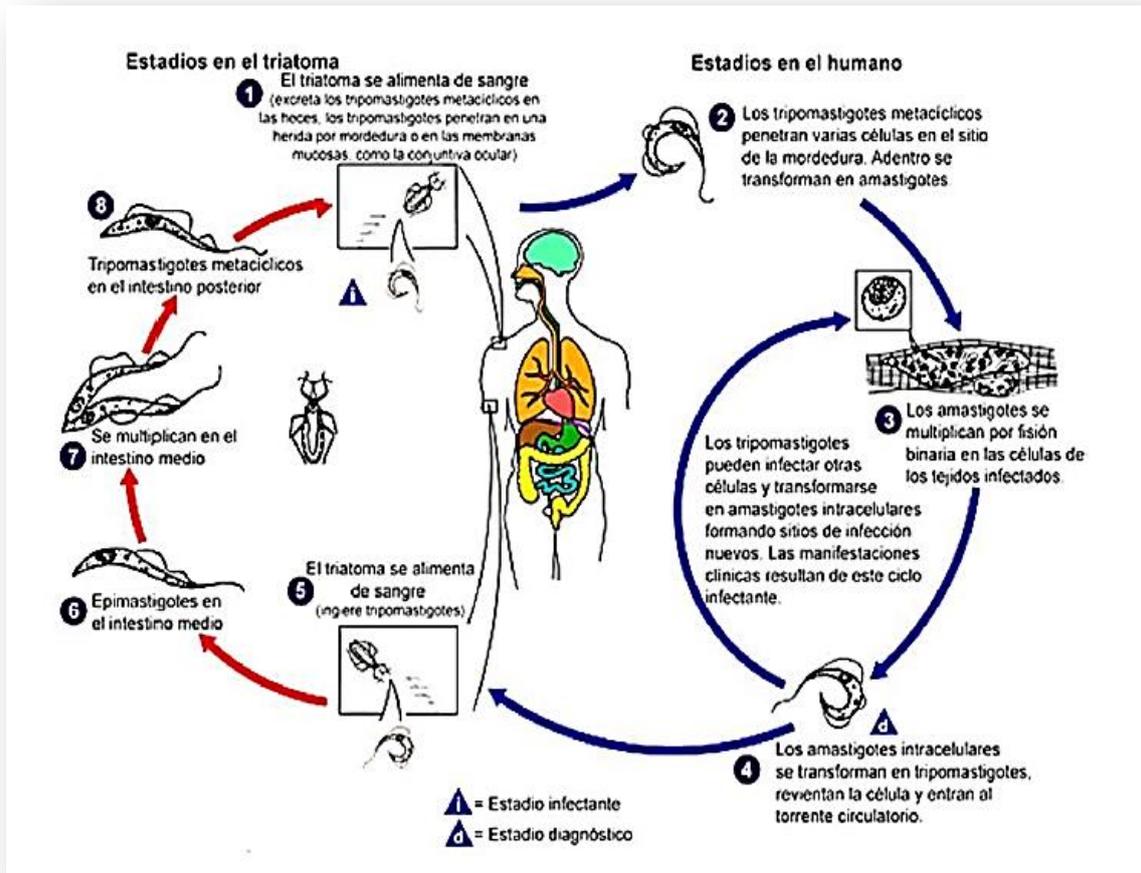


Figura I.3. Ciclo biológico de *T. cruzi*. Fuente: Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Disponible en: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx>.

1.2. Vías de transmisión

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es fundamentalmente una zoonosis, donde el humano es un hospedador accidental.

1.2.1. Transmisión vectorial

Constituye la principal vía de transmisión, en la cual los tripomastigotes metacíclicos presentes en las heces infectadas de los insectos vectores penetran a través de laceraciones en la piel o a través de la mucosa de los mamíferos. Esta vía de transmisión es la causante de más del 80% de los casos conocidos en áreas endémicas (Vazquez-Prokopec *et al.*, 2009). Estos insectos hematófagos pertenecen a la subfamilia Triatominae (orden: *Hemiptera*, familia: *Reduviidae*). Tanto los machos como las hembras se alimentan de sangre en una cantidad que puede llegar hasta 8 o 9 veces su propio peso. Aunque existen más de 130 especies de triatominos solo un grupo de ellos son considerados vectores competentes para *T. cruzi* (Zingales *et al.*, 2012). Las especies con mayor capacidad vectorial y con mayor distribución geográfica son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (Rassi *et al.*, 2009) (figura I.4). Estos triatominos reciben diferentes nombres coloquiales según el país endémico, algunos de ellos son: vinchuca en Bolivia, Argentina y Chile, chipo en Venezuela, chiribico en Colombia o barbeiro en Brasil (Kropf, 2011).

La tripanosomiasis americana se transmite a los seres humanos, a más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos, cobayas, etc.) y a mamíferos silvestres (roedores, marsupiales y armadillos). Existiendo tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* en los cuales el vector participa (Guhl, 2009).

1.2.1.1. Ciclo doméstico

Las malas condiciones de las viviendas (paredes de adobe, techos de paja y grietas) y la presencia de animales domésticos que viven estrechamente con el ser humano, permiten el contacto cercano entre los insectos vectores y el huésped humano. *Triatoma infestans* es el principal vector domiciliado 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.

1.2.1.2. *Ciclo peridoméstico*

Sirve de nexo entre el ciclo doméstico y el selvático. En él intervienen gran variedad de mamíferos (roedores, marsupiales, perros) que entran y salen libremente de las viviendas, y triatominos selváticos que son atraídos a las casas por la luz y el alimento, como *Triatoma dimidiata*.

1.2.1.3. *Ciclo selvático*

Intervienen triatominos selváticos que infectan a numerosas especies y subespecies de mamíferos salvajes, terrestres o arbóreos. Algunos de los más frecuentes son: *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis* y *Triatoma pseudomaculata* en Brasil, *Rhodnius pallescens* en Colombia y Panamá o *Triatoma pallidipennis* en México. En este ciclo selvático, los mamíferos pueden adquirir la infección también al ingerir triatominos infectados.

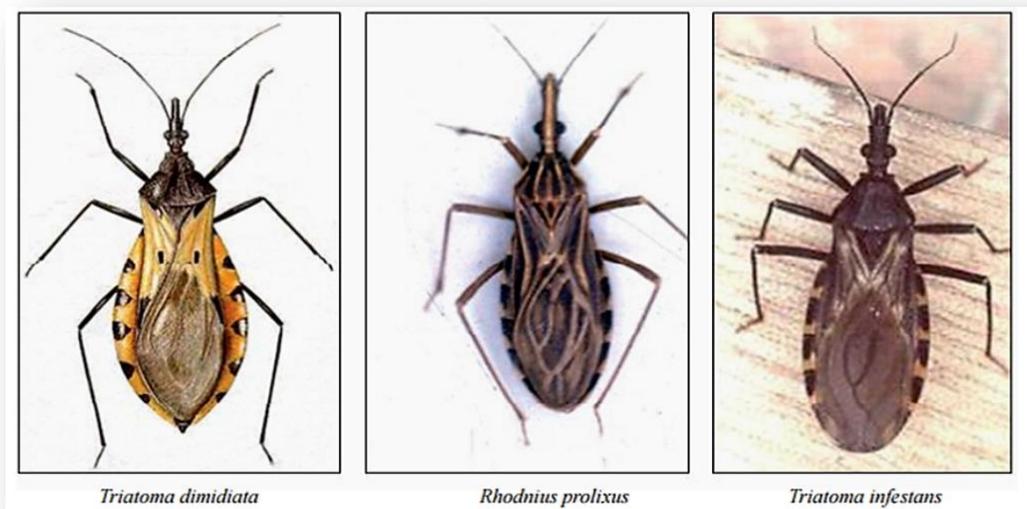


Figura I.4. Principales especies de vectores de la enfermedad de Chagas en seres humanos.
Fuente: adaptado de Guhl (2009).

1.2.2. Transmisión congénita

Fue observada por primera vez por Carlos das Chagas en 1911. Quién describió el caso de dos recién nacidos de madres con enfermedad de Chagas que presentaron convulsiones y fallecieron a los 6 y 8 días de vida, hallándose en sus autopsias la presencia de *T. cruzi* (Chagas, 1911). Cuatro décadas después, en 1949, aparece el primer registro de la infección de Chagas congénita, al describir Luis Dao (1949) la infección por *T. cruzi* en un recién nacido en Venezuela.

La transmisión congénita es la principal vía de transmisión de *T. cruzi* en áreas no endémicas, situándose por encima de las transfusiones sanguíneas y el trasplante de órganos (Carlier y Truyens, 2015). Siendo la responsable de la urbanización de la enfermedad de Chagas, y el principal objetivo para los programas de prevención en la zona no endémica (OMS, 2015).

Un reciente meta-análisis estima que el riesgo de transmisión congénita para los niños nacidos de madres con enfermedad de Chagas se sitúa en torno al 5% (Howard *et al.*, 2014). Los factores de riesgo que se han descrito para la transmisión congénita son: el aumento de la parasitemia materna detectado por microhematocrito o por PCR durante el embarazo (Hermann *et al.*, 2004; Virreira *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2010; Siriano *et al.*, 2011; Bua *et al.*, 2012; Murcia *et al.*, 2013) y la disminución de la respuesta inmune en la madre (Hermann *et al.*, 2004; García *et al.*, 2008) y en el neonato (Torrico *et al.*, 2005; Carlier *et al.*, 2015). Además, se han considerado otros factores que podrían estar implicados como la carga parasitaria (Bern *et al.*, 2009; Bua *et al.*, 2012) o el genotipo de *T. cruzi* implicado en la transmisión materno-fetal (Ortiz *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014). La importancia de la edad de las madres (edad joven), los embarazos gemelares (Kaplinski *et al.*, 2015) y los antecedentes familiares de enfermedad de Chagas, conocido este fenómeno como *family cluster* (Bisio *et al.*, 2011), también han sido descritos como factores que podrían estar asociados a un mayor riesgo de transmisión vertical de la infección por *T. cruzi*.

La infección congénita por *T. cruzi* debe sospecharse en cualquier niño nacido de una mujer embarazada con enfermedad de Chagas. La transmisión

materno-fetal puede darse en cualquier estadio de la infección, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección materna y puede tener lugar en sucesivos embarazos (Bittencourt, 1992; Freilij y Altcheh, 1995; Russomando *et al.*, 1998; Torrico *et al.*, 2004).

Las posibles vías de transmisión materno-fetal de *T. cruzi* son: a través del útero (vía transuterina), líquido amniótico, leche materna (postnatal) y placenta (vía hematogena transplacentaria) (Carlier y Truyens, 2015). Sin embargo, la transmisión de parásito a través de la lactancia (postnatal), líquido amniótico o vía transuterina son poco probables (Virreira *et al.*, 2006; Carlier y Truyens, 2010; Norman y López-Vélez, 2013). La vía hematogena transplacentaria parece ser la única posibilidad para la transmisión prenatal o perinatal (Carlier *et al.*, 2015).

Dentro de la vía hematogena transplacentaria, el parásito puede alcanzar al feto, a través de: la invasión de las vellosidades del trofoblasto (en elevadas parasitemias), la invasión de la zona marginal desprovista del trofoblasto (en parasitemias moderadas), y por rotura o desgarre de membranas durante el parto (Carlier y Truyens, 2015) (figura I.5).

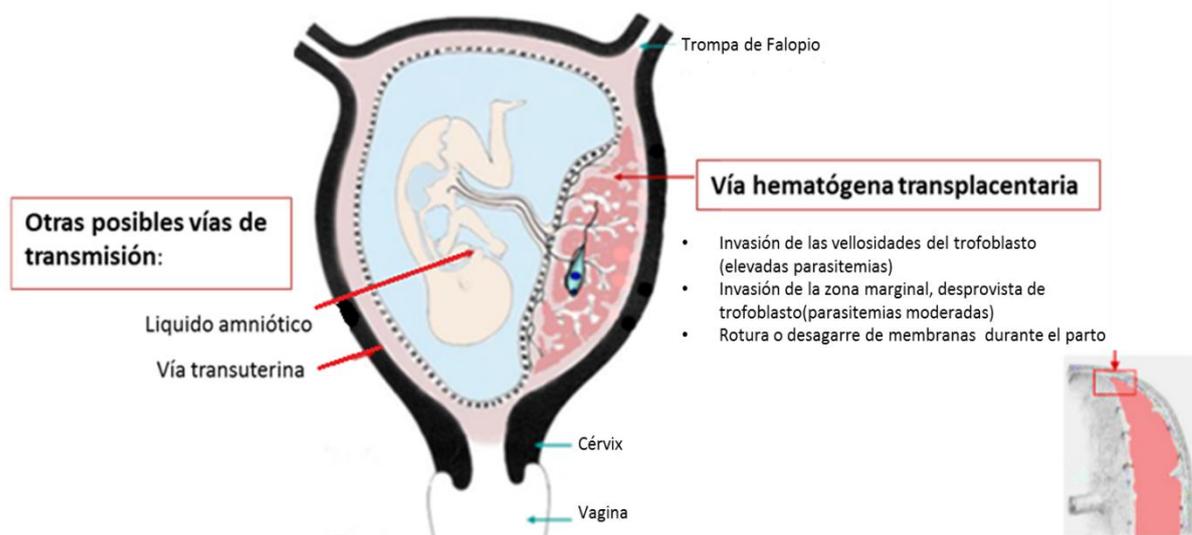


Figura I.5. Posibles vías de transmisión materno-fetal de *T. cruzi*. Fuente: adaptado de Carlier y Truyens (2015).

En cuanto a la transmisión a través de la leche materna, mediante la lactancia, no existen estudios que confirmen esta vía sin poder descartar otras posibilidades como: contaminación con sangre infectada, grietas en los pezones (Medina-Lopes, 1988; Medina-Lopes, 1992) e incluso la propia vía de transmisión vertical (Rassi *et al.*, 2004). Aunque los estudios son escasos, en términos generales no se recomienda la interrupción de la lactancia, a menos que la madre se encuentre en la fase aguda de la enfermedad, que presente una reactivación debido a un estado de inmunosupresión o presente grietas en los pezones. En cuyo caso, debe considerarse someter la leche a un proceso térmico previa lactancia (Norman y López-Vélez, 2013).

La infección congénita por *T. cruzi* implica múltiples y complejas interacciones entre el parásito, la mujer embarazada, la placenta y el feto. Se encuentra asociada con (Carlier y Truyens, 2015):

- Débil respuesta inmune innata y adaptativa materna, lo que contribuye a un aumento de la parasitemia.
- Transmisión del parásito a través de la placenta, más frecuentemente a través de áreas desprovistas del trofoblasto, ya que, esta membrana ésta implicando en la defensa frente a la invasión del parásito.
- Insuficiente respuesta inmune innata y respuesta inmune celular tipo Th1 parásito-específica neonatal para controlar la multiplicación del parásito.

1.2.3. Transmisión transfusional

La transfusión sanguínea de sangre completa o de hemoderivados fue considerada la principal vía de transmisión en áreas urbanas hasta la implantación de leyes para su regulación. Un estudio realizado entre donantes de zonas endémicas observó una seroprevalencia del 0,62%, siendo la tasa de riesgo mayor (10,2%) entre los inmigrantes procedentes de Bolivia (Piron *et al.*, 2008).

En España, donde existe una población latinoamericana numerosa, se han descrito tres casos de transmisión mediante vía transfusional (Villalba *et al.*, 1992; Flores-Chávez, *et al.*, 2007; Forés *et al.*, 2007). En nuestro país se publicó en el año 2005, el Real Decreto 1088/2005, por el que se obliga a todos los centros de transfusión a realizar estudio serológico a todo donante nacido en área endémica, hijo de madre nacida en área endémica o que haya sido transfundido en países donde la enfermedad es endémica.

1.2.4. Transmisión por donación de órganos

Los receptores sanos de un donante infectado con *T. cruzi* están en riesgo de desarrollar la infección. Se han descrito varios casos de Chagas agudo en receptores de órganos residentes en áreas no endémicas. Los casos de infección por *T. cruzi* mediante esta vía son de especial gravedad dado el estado de inmunodepresión inducida en los trasplantes (Barcán *et al.*, 2005). En España, se han adoptado medidas por la Organización Nacional de Trasplante Española. El cribado es obligado a todo donante de órganos nacido o residente en una zona endémica ya que la infección en fase aguda contraindica cualquier tipo de donación. En caso de infección fase crónica ésta contraindicado el trasplante de corazón. En los casos de trasplante renal en los que se han utilizado donantes con infección crónica en receptores seronegativos, se ha observado una tasa de transmisión del 35% y la aparición de enfermedad aguda hasta 14 meses tras la intervención (Len y Pahissa, 2007)

1.2.5. Transmisión oral

La transmisión oral ha sido considerada una forma rara e inusual, sin embargo, en los últimos años esta forma de transmisión ha llamado la atención en países como Brasil, Venezuela y Colombia, describiéndose brotes de enfermedad de Chagas agudo asociados a la ingesta de alimentos o bebidas contaminadas con el parásito (Ríos *et al.*, 2011; Díaz y González, 2014). La

contaminación de los alimentos se produce por el contacto de estos con las heces del vector infectado, cuando inadvertidamente se tritura el insecto durante la preparación de los mismos o cuando son contaminados con secreciones anales de marsupiales infectados. Los alimentos asociados con este tipo de transmisión han sido jugo de caña y de frutas (açai, guayaba y naranja); comida casera como: sopa, caldo, leche, agua y carne de caza (Nóbrega *et al.*, 2009; Alarcón de Noya *et al.*, 2010).

La transmisión oral de la enfermedad de Chagas constituye una importante vía de transmisión caracterizada por una gran morbilidad y mortalidad. Además, presenta aspectos epidemiológicos diferentes a los de la transmisión vectorial, tales como: ocurrencia de casos en forma de brotes pequeños y presencia en zonas de baja endemia, ya sean rurales o urbanas, donde no hay vectores domiciliados (Díaz y González, 2014).

1.2.6. Transmisión por accidente de laboratorio

Se trata de un modo de transmisión accidental, que se ha descrito de manera esporádica, a través de la vía conjuntival por aerosoles producidos tras centrifugar muestras contaminadas o por pinchazos con agujas infectadas (Herwaldt, 2001).

2. Epidemiología

Actualmente se estima que entre 6 y 7 millones de personas están infectadas por *T. cruzi*, la mayoría en América latina, y más de 25 millones están en riesgo de contraer la enfermedad de Chagas (OMS, 2015). El perfil epidemiológico global de la enfermedad de Chagas es el resultado de la transmisión vectorial doméstica que se produce a lo largo de toda la vida en la población de América Latina y los movimientos migratorios a gran escala producidos en los últimos 50 años de zonas rurales a urbanas (Bern, 2015).

2.1. Zona endémica

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida desde el sur de EEUU hasta el norte de Chile y Argentina, afectando a 21 países de Latinoamérica, de los cuales dos terceras partes son países pertenecientes al Cono Sur. El principal mecanismo de transmisión es el vectorial y el vector domiciliario es el de mayor relevancia epidemiológica (Bern, 2015). Los países con más casos, estimados en valores absolutos, son Argentina, Brasil y México, seguido de Bolivia. En función de la vía de transmisión: Bolivia, Argentina y Paraguay (en concreto una amplia región conocida como el Gran Chaco) liderarían los países con mayor número de casos adquiridos por transmisión vectorial; en cambio, Argentina, México y Colombia serían los países con mayor número de casos estimados debidos a transmisión vertical (OMS, 2015; Molina *et al.*, 2016). En la tabla I.1 se muestran los países donde existe enfermedad de Chagas endémica.

Tabla I.1. Países donde la enfermedad de Chagas es endémica

Argentina	Ecuador	Nicaragua
Belice	El Salvador	Panamá
Bolivia	Guatemala	Paraguay
Brasil	Guayana	Perú
Chile*	Guayana Francesa	Surinam
Colombia	Honduras	Uruguay*
Costa Rica	México	Venezuela

*Países en los que se ha logrado interrumpir la transmisión vectorial, pero continúan existiendo personas infectadas.

A continuación se describe brevemente la prevalencia de la enfermedad de Chagas en las diferentes regiones de América Latina (OPS, 2006; Stanaway y Roth, 2015):

Bolivia: el 31.5% de la población boliviana vive en áreas endémicas. Es el país con mayor prevalencia de enfermedad de Chagas con un valor del 6.8%; aunque en determinadas zonas del país se ha llegado a detectar una seroprevalencia de hasta el 50%.

Ecuador: el 46.9% de la población vive en áreas endémicas. La seroprevalencia es del 1.7%, aunque se han detectado variaciones del 0 al 6% según en los estudios publicados.

Perú: el 12.4% de la población vive en áreas endémicas y la seroprevalencia estimada es del 0.7%.

Colombia: el 10% de la población vive en áreas endémicas y la seroprevalencia estimada esta próxima al 1%.

México: el 27.6% de la población vive en áreas endémicas y la seroprevalencia estimada es aproximadamente de un 1%.

Panamá: Aunque se estima que el 30.9% de la población vive en área endémica, la seroprevalencia es solo del 0.006%.

Venezuela: el 18.5% de la población vive en áreas endémicas y la seroprevalencia estimada es del 1.2%.

Argentina: el 18.8% de la población vive en áreas endémicas. Es el país con mayor seroprevalencia de enfermedad de Chagas del cono sur con un 4.1%.

Chile y Uruguay: aunque se ha conseguido interrumpir la transmisión vectorial en estos dos países un 1% de la población continúa estando infectada.

Brasil: el 12% de la población vive en áreas endémicas y la seroprevalencia estimada es del 1%.

En cuanto a la incidencia, se estima que de manera general es menor del 1% al año, siendo la mayor tasa de incidencia registrada del 4% en la zona hiperendémica del Chaco en Bolivia (figura I.6).

Solo en 2008, más 10.000 muertes por enfermedad de Chagas fueron documentadas. Desde 1990 varias iniciativas multinacionales han permitido una disminución significativa del número de casos de enfermedad de Chagas, de 18 millones en 1991 a 5,7 millones en 2010. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) ha certificado la interrupción de la transmisión vectorial en varios países de América del Sur y América central. Sin embargo, la enfermedad de Chagas sigue siendo la enfermedad

parasitaria más importante en el hemisferio occidental. Se estima que la carga de la enfermedad, medida en años de vida ajustados por discapacidad, es 7,5 veces mayor que la de malaria (Molina *et al.*, 2016).

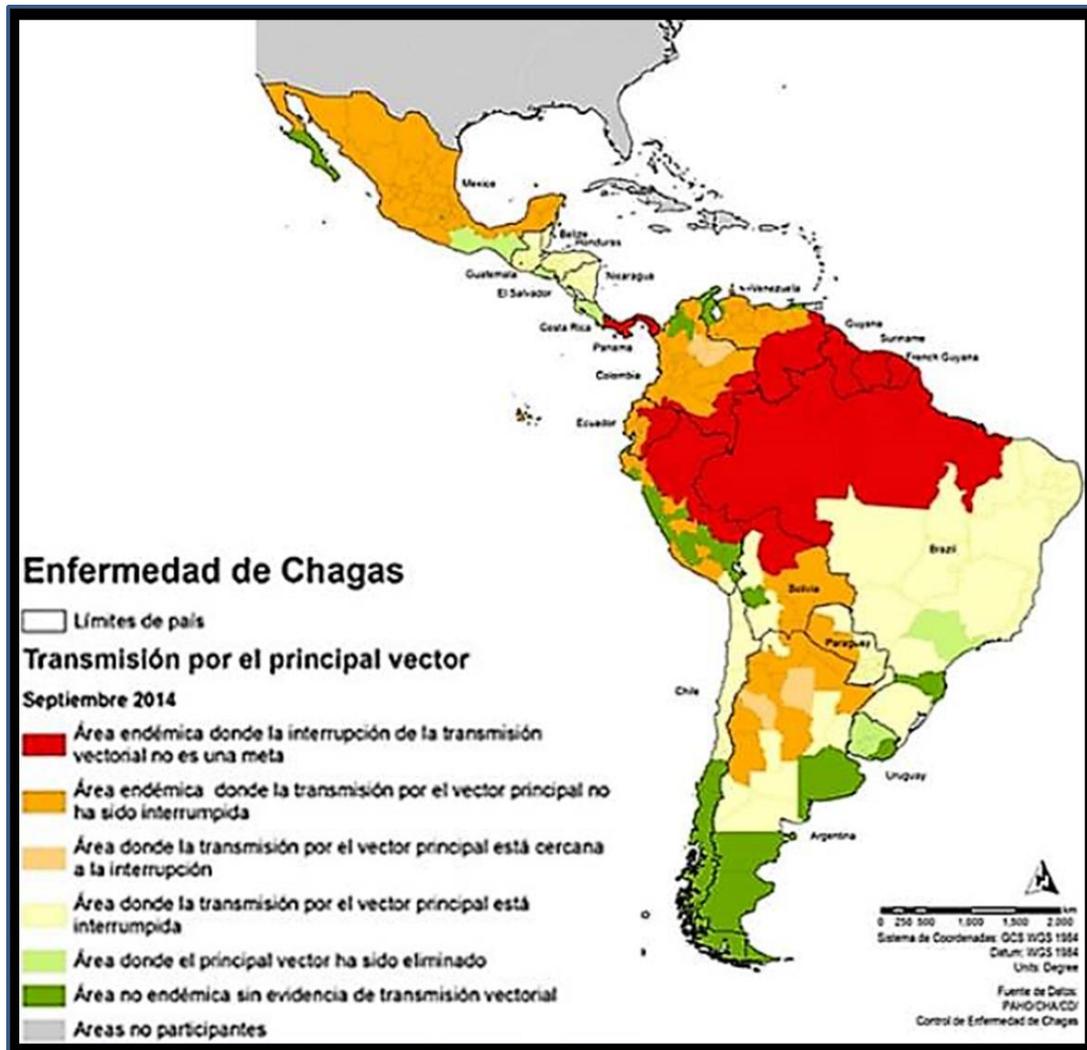


Figura I.6. Mapa de los países donde la enfermedad de Chagas es endémica. Fuente: Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS), mapa de control de la enfermedad de Chagas, 2014. Disponible en: <http://www2.paho.org/hq/>

2.2. Zona no endémica

En los últimos años los movimientos de población de personas infectadas han llevado a la exportación de casos de enfermedad de Chagas desde América Latina a

países como España, Alemania, Australia, Canadá, Francia, Italia, Japón o los Estados Unidos (figura I.7). Se estima que entre 80.000 y 120.000 inmigrantes con enfermedad de Chagas viven en Europa, y unos 300.000 en Estados Unidos (Basile *et al.*, 2011).

Como consecuencia de estos cambios epidemiológicos, en el año 2010 en la 63 Asamblea Mundial de la Salud se aprobó una nueva resolución que reconoció el aumento del número de casos de la enfermedad de Chagas en países no endémicos y puso de manifestó que todas las vías de transmisión tenían que ser abordadas.

España es el segundo país del mundo que más inmigrantes ha recibido en la última década, después de Estados Unidos. Más de un tercio procede de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas. Además, es el país europeo que mayor número de inmigrantes recibe de Latinoamérica. Esto indicaría que España es el país europeo con mayor carga de enfermedad de Chagas (Lee *et al.*, 2013), representando esta situación un gran reto para la salud pública. La prevalencia es diferente para cada conjunto de inmigrantes según su país de procedencia. Se estima que más de 50.000 personas están infectadas en España (Basile *et al.*, 2011), de las cuales un 60% son mujeres en edad fértil (Navarro *et al.*, 2012).

Diversos estudios realizados principalmente en mujeres embarazadas y donantes de sangre estiman que la seroprevalencia en España oscila entre el 1 y el 11%. Se ha observado una seroprevalencia mayor entre las mujeres embarazadas latinoamericanas de origen boliviano, principalmente de áreas rurales. En Barcelona se ha descrito una seroprevalencia del 3,4% en 1.350 embarazadas residentes en España (Muñoz *et al.*, 2009), en Valencia se han detectado seroprevalencias del 11,5% (Barona-Vilar *et al.*, 2012), 1,3% (Elche) (Ramos *et al.*, 2012) y en un estudio más reciente, realizado en Alicante (Valencia) se detectó una seroprevalencia del 3,01% en 465 embarazadas (Ramos *et al.*, 2014). En donantes de sangre de población de riesgo la prevalencia descrita fue del 0,62%, aumentando al 10,2% si el país de origen era Bolivia (Piron *et al.*, 2008). Otro estudio realizado en 766 inmigrantes latinoamericanos de los cuales el 95,5% procedían de Bolivia atendidos en atención primaria, estima una seroprevalencia del 2,87% (Roca *et al.*, 2011).

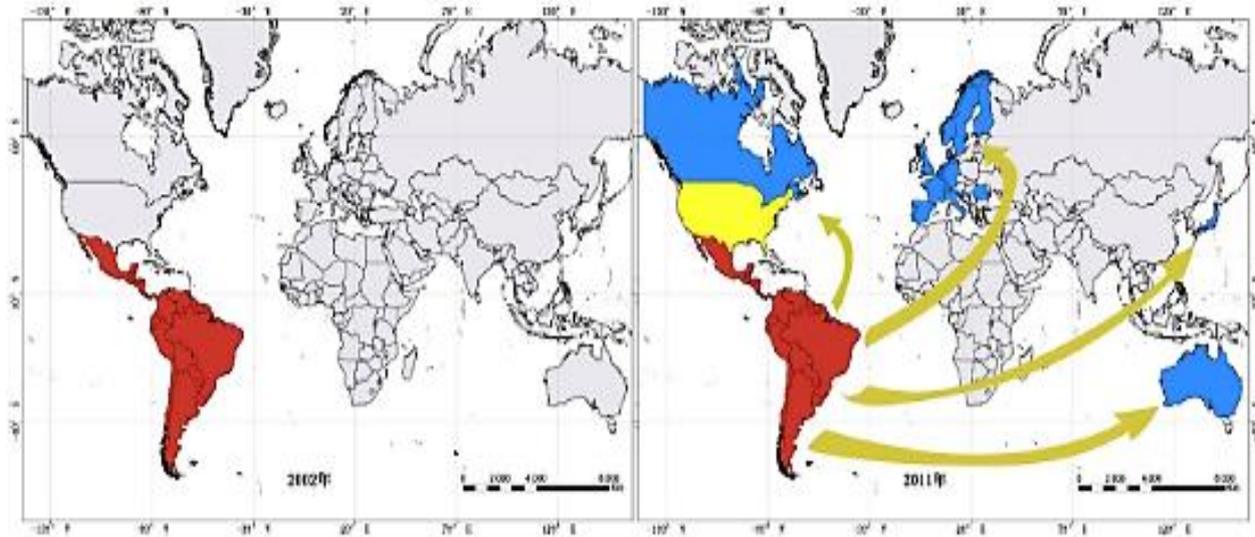


Figura I.7. En el mapa se muestran los cambios epidemiológicos producidos en la enfermedad de Chagas entre 2002 y 2011. En color rojo están los países endémicos donde la transmisión de la enfermedad es vectorial; en color amarillo los países donde la transmisión es ocasional a través del vector; y en color azul los países no endémicos donde la transmisión de la infección por *T. cruzi* es vertical, por donación de sangre y órganos.... Fuente: adaptado de Liu *et al.* (2015).

2.3. Chagas congénito

Actualmente 1.125.000 mujeres en edad fértil están infectadas por *T. cruzi* en América Latina. Se estima que la incidencia de infección congénita es de 8.668 casos por año, estando alrededor del 50% de los casos agrupados en México, Argentina y Colombia (OMS, 2015). Aunque la transmisión materno-fetal de *T. cruzi* se produce en torno al 5% de las madres crónicamente infectadas en áreas endémicas, se han observado grandes variaciones entre los diferentes países, que van del 4,4 al 11,3% en Argentina, del 3,4 al 17,1% en Bolivia, del 0,2 al 5,2% en Brasil, del 2,5 al 11,1% en Chile y del 5,6 al 10% en Paraguay (Messenger *et al.*, 2015)

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas también ha sido documentada en zonas no endémicas, debido a la migración de mujeres infectadas en edad fértil de Latinoamérica a Norteamérica y Europa, principalmente Estados Unidos y España. Lo

que hace que esta vía de transmisión sea la más importante en zonas no endémicas y que constituya un problema de salud pública a nivel mundial (Carlier *et al.*, 2015).

En España, hasta la fecha se han realizado dieciocho estudios sobre la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi*. Se han detectado 32 niños con enfermedad de Chagas congénita de 743 nacidos de madres infectadas, lo que supone una tasa global de transmisión vertical en España de 4,3% (Howard *et al.*, 2014). Sin embargo en estos 18 estudios las tasas de transmisión vertical descritas varían del 0,75 al 28,6%. Estas variaciones son debidas al país o región de origen y a la zona de procedencia, rural o urbana.

2.4. Epidemiología molecular

El propósito principal para la caracterización molecular de *T. cruzi* y sus múltiples genotipos está dirigido hacia su asociación con la clínica y la patogénesis de la enfermedad, así como al esclarecimiento de los diferentes escenarios de transmisión y los aspectos co-evolutivos relacionados con reservorios e insectos vectores. La caracterización molecular de los diferentes aislamientos a partir de humanos, insectos y reservorios, ha permitido identificar la amplia variabilidad genética del parásito.

En el año 1999 se estableció por primera vez un consenso internacional sobre la nomenclatura de *T. cruzi* y se acordó la inclusión de dos linajes genéticos diferentes, el linaje TcI como un grupo genético homogéneo y el TcII, que posteriormente se subdividió en cinco subgrupos designados como TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe (Souto *et al.*, 1996). Más recientemente, en 2009 se propuso una nueva nomenclatura para *T. cruzi*, la cual incluye seis unidades discretas de tipificación (UDTs) denominadas como *T. cruzi* I (TcI), *T. cruzi* II (TcII), *T. cruzi* III (TcIII), *T. cruzi* IV (TcIV), *T. cruzi* V (TcV) y *T. cruzi* VI (TcVI), basada en marcadores diferentes moleculares y características biológicas del parásito (Zingales *et al.*, 2009). Actualmente se ha propuesto un nuevo genotipo llamado TcBat, relacionado genéticamente con TcI. Ese genotipo ha sido descrito en el centro y norte de Sudamérica (Pinto *et al.*, 2012).

En la figura I.8 se muestra la distribución geográfica de las 6 UDTs y su correspondencia con los ciclos de transmisión selváticos y domésticos.

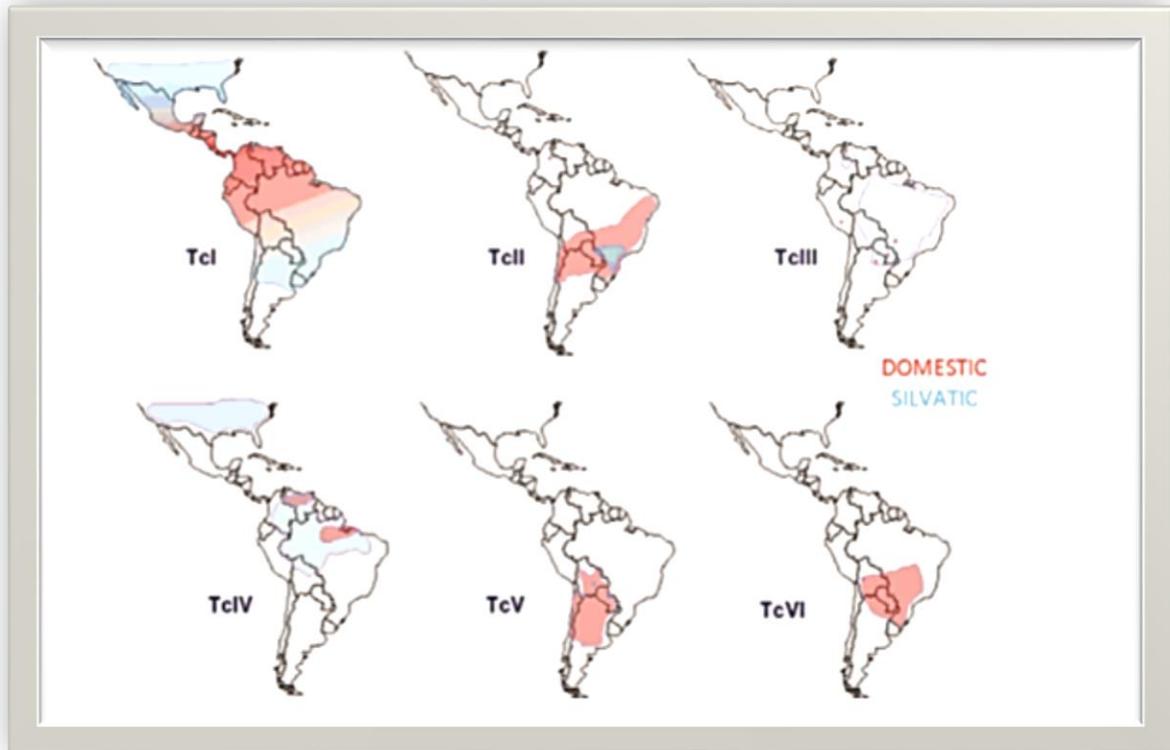


Figura I.8. Distribución geográfica de las 6 UDTs. TcI es el genotipo predominante en la región norte del Amazonas, TcII, TcV y TcVI en las regiones del Cono sur y el TcIII y TcIV sólo infectan de manera esporádica a los seres humanos. Los ciclos selváticos aparecen representados en rojo y los ciclos domésticos en azul.

En el cono sur, donde *T. infestans* es el vector mayoritario, los genotipos TcII, TcV y TcVI son los principales agentes causantes de la enfermedad de Chagas. El genotipo TcII predomina en Brasil, TcV en Argentina, Bolivia y Paraguay y el TcVI en el Gran Chaco. El genotipo TcIV es la segunda causa de enfermedad de Chagas en Venezuela.

Establecer una asociación entre la diversidad de *T. cruzi* y las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas es complicado dada la dinámica de la infección producida por *T. cruzi*, así como las limitaciones actuales en las técnicas de tipificación del parásito. Además se ha descrito una elevada incidencia de infecciones mixtas producidas por diferentes cepas de *T. cruzi* tanto en humanos como en vectores y

reservorios mamíferos (Bosseno *et al.*, 2010). Se ha descrito que las formas cardíacas en países del Cono Sur son causadas por los genotipos TcII, TcV y TcVI, más recientemente se ha demostrado que también el genotipo TcI juega un papel importante en las formas graves de cardiopatía chagásica. Mientras que los casos de enfermedad de Chagas aguda resultantes de brotes orales que han tenido lugar principalmente en la región Amazónica, han sido causados por el genotipo TcI, y en menor grado por TcIII y TcIV.

También se han llevado a cabo estudios sobre la posible asociación entre el genotipo y la transmisión vertical de *T. cruzi*. Se han descrito diferentes tasas de transmisión según el área geográfica en las que predominan diferentes cepas del parásito, así como, se ha descrito que determinados genotipos pudieran presentar un mayor tropismo y adaptación para la infección transplacentaria (Ortiz *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014). Todos los genotipos han sido identificados en infecciones congénitas excepto el TcIV. El genotipo TcV es el más frecuentemente identificado, presente en el 80-100% de los casos de Chagas congénito en Bolivia, Argentina, sur de Brasil, Chile 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 (Virreira *et al.*, 2007; del Puerto *et al.*, 2010; Carlier y Truyens, 2015). Aunque normalmente se ha detectado el mismo genotipo en la madre y en el niño infectado; existen trabajos que describen casos de infecciones mixtas con discordancias entre los genotipos identificados en la madre y el neonato. Estos casos podrían deberse a una mutación de la cepa por la rápida multiplicación del parásito en la infección aguda neonatal, o bien al paso selectivo de una subpoblación del parásito (Ortiz *et al.*, 2012; García *et al.*, 2014).

3. Patogenia de la enfermedad de Chagas

A lo largo de las últimas décadas han surgido una serie de hipótesis que tratan de explicar los cambios patológicos que ocurren durante fase crónica de la enfermedad de Chagas, como son la autoinmunidad y la persistencia del parásito (Teixeira *et al.*, 2011). La aparición tardía de las lesiones tisulares en relación con la infección aguda y la

ausencia del parásito, especialmente en los sitios de intensa inflamación, condujeron a proponer que la patología crónica era el resultado de una respuesta contra antígenos propios del huésped (Cunha-Neto *et al.*, 1995). Esta idea tuvo sus comienzos en la década de 1990, cuando se demostró que varias proteínas de *T. cruzi*, incluyendo proteínas ribosomales y otros antígenos, tenían reacción cruzada con proteínas humanas tales como la miosina cardíaca, antígenos linfocitarios, proteínas del tejido neuronal, proteínas ribosomales, antígenos musculares y ribonucleoproteínas (Kierszenbaum, 1999; Leon y Engman, 2001).

Posteriormente gracias al desarrollo de técnicas más sensibles, tales como la inmunohistoquímica y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), permitieron demostrar que productos del parásito, ADN y antígenos proteicos, persisten en la fase crónica de la enfermedad asociados a los focos de daño tisular. Por tanto, la persistencia del parásito actuaría como estímulo que activa una respuesta de hipersensibilidad retardada mediada por células T específicas que conduce al daño en los tejidos del huésped (Nagajyothi *et al.*, 2012). Este hecho, junto con que el tratamiento antiparasitario ha demostrado su eficacia en la eliminación del parásito y la reducción de la gravedad de la enfermedad (Viotti *et al.*, 2006; Villar *et al.*, 2014), apoyan la hipótesis de que la persistencia del parásito en el órgano y tejido es el estímulo primario para perpetuar la inflamación y es el responsable de incrementar la respuesta inmune frente al parásito.

3.1. Fases de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas pasa por dos fases claramente diferenciadas: una fase aguda y otra crónica que a su vez se divide en crónica indeterminada y crónica sintomática (Prata, 2001). Las manifestaciones clínicas agudas se observan generalmente en niños, mientras que las crónicas e irreversibles aparecen en etapas ulteriores de la vida (figura I.9).

3.1.1. Fase aguda

Se inicia en el momento de adquirir la infección por cualquiera de sus vías y tiene una duración entre 2 y 4 meses. Se caracteriza por presentar parasitemia circulante detectable en sangre periférica y, en aproximadamente el 90% de los casos, ausencia de sintomatología. Durante los primeros 15 días puede presentarse el llamado «chagoma de inoculación», un nódulo subcutáneo con adenitis regional en el sitio de la picadura que es producto de la multiplicación de los amastigotes de *T. cruzi* dentro de los macrófagos locales. En casos de inoculación ocular, es posible identificar el «signo de Romaña», edema bpalpebral unilateral, con adenitis retroauricular, característico de la enfermedad, aunque poco frecuente. Tras esta fase localizada, el parásito se disemina sistémicamente invadiendo ganglios linfáticos y distintos órganos (bazo, médula ósea, corazón, tubo digestivo, cerebro) pudiendo aparecer, entre la segunda y la tercera semana después de la infección, un cuadro de fiebre sin un patrón característico, malestar general, hepatoesplenomegalia, linfadenopatías generalizadas o anemia entre otros síntomas (Prata, 2001). La mortalidad durante la fase aguda es baja, menor del 1%, y puede producirse como resultado de una miocarditis aguda o meningoencefalitis. Afectando principalmente a sujetos inmunocomprometidos y niños. Las manifestaciones agudas desaparecen de manera espontánea en la mayoría de los enfermos, dando paso a una fase indeterminada o crónica asintomática.

3.1.2. Fase crónica

Esta etapa se divide en dos fases: una fase crónica indeterminada o asintomática y fase crónica sintomática.

Un 95% de las personas infectadas por *T. cruzi* pasan a la fase indeterminada de la enfermedad. De estos pacientes, aproximadamente el 70% continúan asintomáticos el resto de su vida con un alto número de anticuerpos anti-*T. cruzi* y una parasitemia subclínica. Tras 10-30 años de infección, un 30% de los

pacientes crónicos desarrollan formas de sintomatología de la enfermedad (Rassi *et al.*, 2010). Ésta se caracteriza fundamentalmente por compromiso visceral irreversible en forma de cardiomiopatía de diferentes grados de gravedad (20-30%), manifestaciones gastrointestinales en forma de megaesófago o megacolon (8-10%) o ambas (10%). Menos de un 5% de las personas desarrollan la forma neurológica de la enfermedad con afectación del sistema nervioso periférico.

3.2. Manifestaciones de la enfermedad de Chagas

3.2.1. Cardíaca

La afectación cardíaca es el aspecto más importante a tener en cuenta en un paciente con enfermedad de Chagas, principalmente debido a su frecuencia y a sus consecuencias, apareciendo en un 20-30% de los pacientes infectados por *T. cruzi*. La cardiopatía chagásica crónica, se denomina también miocardiopatía dilatada al manifestarse por una cardiomegalia, a menudo visible por medio de una radiografía simple de tórax. Se define como una miocarditis crónica o un estado de inflamación progresiva, que con el tiempo conduce a un cuadro de fibrosis miocárdica y que puede desencadenar espontáneamente una arritmia ventricular. Los síntomas se deben a trastornos del ritmo cardíaco, cardiopatía congestiva y tromboembolias (Salomone, 2003). La primera manifestación de esta enfermedad puede ser la muerte súbita de origen arrítmico. El alto índice de mortalidad asociado con la afectación de miocardio puede ser explicado por varios factores relacionados y no exclusivos, incluyendo la extensión del daño en miocardio, el deterioro de la función cardíaca y la presencia de arritmia ventricular. La alteración observada con mayor frecuencia en el electrocardiograma es el bloqueo de rama derecha del haz de His (Gascón *et al.*, 2007).

Entre un 20 y un 30% de las personas con infección por *T. cruzi* en área endémica tienen afectación cardíaca subclínica, demostrada precozmente en el

ECG, por tanto es importante realizar pruebas de afectación orgánica independientemente de la presencia de sintomatología que la sugiera.

3.2.2. Digestiva

Las manifestaciones gastrointestinales crónicas de la enfermedad de Chagas son, principalmente, una consecuencia de una lesión del sistema nervioso entérico causada por la infección por *T. cruzi*. Las más frecuentes son megaesófago y megacolon. Otras alteraciones son megaestómago, megaduodeno, megayeyuno, megaíleon; así como trastornos motrices gastrointestinales, tales como la acalasia esofágica, alteraciones del vaciado gástrico, alteración del tránsito intestinal y estasis biliar (Oliveira *et al.*, 1998). Las complicaciones digestivas más comunes son: disfagia, odinofagia, dolor torácico y regurgitación, todas ellas debidas a un megaesófago (Rezende, 2007). La complicación más común del tracto gastrointestinal es el megacolon chagásico, que afecta al 6,3% de los pacientes con enfermedad de Chagas, se manifiesta con dolor abdominal y estreñimiento crónico (Castro *et al.*, 2010).

3.2.3. Congénita

La infección congénita por *T. cruzi* es una infección aguda y en la mayoría de los casos asintomática. Solo en torno al 10 % de los niños infectados desarrollan manifestaciones clínicas (Torricco *et al.*, 2004). Los signos y síntomas son inespecíficos, pudiendo manifestarse incluso antes del nacimiento (abortos espontáneos y muerte fetal), en el momento del nacimiento (bajo peso al nacer, bajo índice de Apgar y prematuridad) o en las horas o días que siguen al alumbramiento (hepatoesplenomegalia, distress respiratorio, miocarditis, anemia, ictericia, etc.) (Carlier, 2010). Los casos más graves pueden cursar con alteraciones cardíacas y meningoencefálicas. Los datos sobre mortalidad neonatal no son concluyentes, aunque se estima que entre el 5% y el 14% de los

niños infectados mueren si no reciben tratamiento (Garcia-Bournissen *et al.*, 2009).

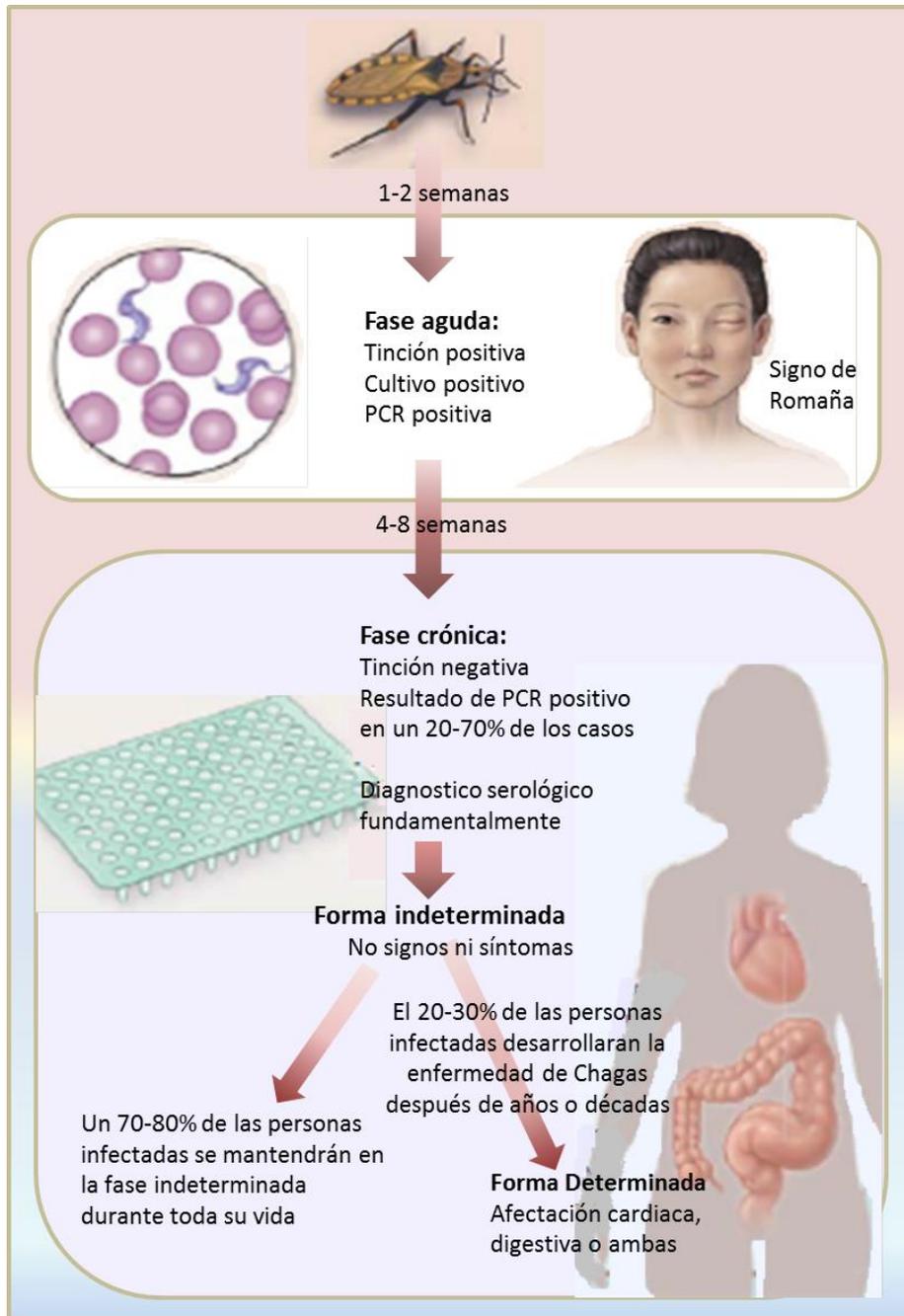


Figura I.9. Fases de la infección por *T. cruzi*. Fuente: adaptada Bern (2015).

4. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se basa en la evaluación clínica, y pruebas de laboratorio. Dependiendo de la fase clínica de la enfermedad, el diagnóstico de laboratorio puede realizarse mediante métodos directos o indirectos.

El diagnóstico en la fase aguda de la enfermedad se realiza mediante métodos parasitológicos directos, puesto que durante la fase aguda existe una parasitemia elevada. En la fase crónica (asintomática o sintomática) el diagnóstico se realiza mediante métodos indirectos o serológicos, ya que, aunque la parasitemia persiste va descendiendo paulatinamente y es difícilmente detectable. En cambio en esta etapa se produce un aumento de la producción de anticuerpos específicos de tipo IgG (inmunoglobulinas G) frente *T. cruzi*. Estos anticuerpos, en la mayoría de los pacientes, estarán presentes durante toda la vida.

4.1. Diagnóstico parasitológico

La **observación microscópica en fresco** de la sangre periférica permite distinguir la presencia del parásito debido a sus rápidos movimientos entre las células sanguíneas. Mientras que la **tinción Giemsa de gota gruesa o del frotis sanguíneo**, permiten observar las características morfológicas del parásito. Cuando el nivel de parasitemia es bajo para mejorar el rendimiento se emplean métodos de concentración, como el método Strout (Strout, 1962) en adultos o el microhematocrito (Feilij *et al.*, 1983) en recién nacidos.

El método de Strout consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 ml de sangre recogida sin anticoagulante, se incuba a 37°C durante 1 h para que se retraiga el coágulo y los tripomastigotes queden suspendidos en el sobrenadante. Tras varios ciclos de centrifugación, el sedimento se observa a 400 aumentos.

El método del microhematocrito o tubo capilar heparinizado consiste en el análisis del movimiento de los parásitos en la interfase entre el empaquetado de hematíes y el

plasma (capa de leucocitos), en la que se observan los movimientos del parásito con el objetivo de 40 aumentos.

El xenodiagnóstico consiste en la aplicación de triatominos de laboratorio en el antebrazo o las piernas del paciente para que ingurgiten sangre y mensualmente examinar la presencia de tripomastigotes metacíclicos en su contenido rectal, durante un período de tres meses. Actualmente se puede realizar de forma artificial, la sensibilidad es la misma que la que se obtiene con el xenodiagnóstico tradicional y se evita la exposición directa del paciente al triatomo.

En el **hemocultivo** se emplea la sangre previamente centrifugada para retirar los anticuerpos que pueden interferir en el crecimiento de *T. cruzi*. Los medios utilizados son el NNN (Novy-McNeal-Nicolle) o bien el medio de LIT (Liver Infusion Tryptose) suplementado con un 20 % de suero bovino fetal. El objetivo es conseguir la multiplicación de las formas parasitarias presentes en la sangre del paciente. El rendimiento del cultivo se incrementa con el volumen de sangre empleado, requiriéndose un volumen de 30 ml de sangre recogida con heparina. Los cultivos se mantienen en estufa a 28 °C, se examinan mensualmente y se deben mantener al menos durante 3 meses antes de dar un resultado negativo.

El hemocultivo y el xenodiagnóstico son métodos tradicionales que presentan una sensibilidad variable, requieren largos tiempos de incubación y únicamente se realizan en laboratorios especializados. Pese a ello, presentan la gran ventaja de permitir el aislamiento de la cepa de *T. cruzi* para la realización de estudios de epidemiología molecular.

4.2. Diagnóstico molecular

Con la introducción de las técnicas de biología molecular, la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cobra especial interés para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Esta técnica se basa en la detección de secuencias diana del parásito, empleando para ello cebadores específicos dirigidos frente a estas secuencias. Existen numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*. Para el diagnóstico las secuencias diana más comúnmente utilizadas son el ADN satélite de *T. cruzi* (Moser *et al.*, 1989) y la región variable del ADN de los minicírculos del

kinetoplasto de *T. cruzi* (ADNk) (Wincker *et al.*, 1994). El ADN satélite ésta formado por aproximadamente 120.000 copias de una secuencia repetida en tándem de 195 pares de bases (pb), lo que representa el 10% del parásito. Y el ADN de las regiones variables de los minicírculos del kinetoplasto, presenta generalmente entre 10.000 y 30.000 minicírculos y cada uno de estos presenta cuatro copias de la región variable, por lo tanto, se encuentran hasta 120.000 copias por parásito de la secuencia a amplificar. Ambas dianas han sido empleadas en diferentes estudios (Junqueira *et al.*, 1996; Kirchoff *et al.*, 1996; Virreira *et al.*, 2003; Duffy *et al.*, 2013), obteniendo una buena sensibilidad y especificidad, sobre todo en la fase aguda de la enfermedad. A pesar de que ambas secuencias presentan un número de copias similar, las diferencias de sensibilidad descritas en los diferentes trabajos podrían deberse a las condiciones de optimización de la reacción, fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente y tipo y cantidad de la muestra.

La PCR ésta indicada fundamentalmente para el diagnóstico de la infección aguda, presentando especial interés en el diagnóstico de la infección congénita, así como en el caso de reactivaciones en pacientes inmunodeprimidos o en trasplantados, puesto que estos grupos de pacientes se encuentran en la fase aguda de la infección y cursan con elevadas parasitemias. Además en este grupo de pacientes, bien por el paso de anticuerpos maternos de la madre al niño o por el estado de inmunosupresión, el diagnóstico serológico tiene una utilidad limitada. Durante la infección crónica, que cursa con una parasitemia fluctuante, la sensibilidad de la PCR varía alrededor del 50-70%. No resultando ser adecuada esta técnica para el diagnóstico en la fase crónica (Pérez-Molina *et al.*, 2015). En cambio, se ha demostrado que la PCR tiene especial utilidad en el seguimiento del tratamiento de los pacientes en fase crónica. Permitiendo conocer precozmente la susceptibilidad del parásito al tratamiento y detección de casos refractarios, cuando se obtienen resultados de PCR positivos durante los controles post-tratamiento (Murcia *et al.*, 2010). Esta técnica resulta igualmente útil en el seguimiento post-tratamiento de los niños (Schijman *et al.*, 2003).

Se han realizado grandes esfuerzos para llevar a cabo la validación internacional de la técnica de PCR (Schijman *et al.*, 2011). Sin embargo, a pesar de ser una técnica ampliamente utilizada e incluida en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, actualmente no se dispone de un protocolo de PCR estandarizado.

El desarrollo de PCR cuantitativas frente al ADN de *T. cruzi* permite además conocer la carga parasitaria. Esta técnica se está empleando principalmente con fines de investigación para conocer la implicación de la carga parasitaria en la transmisión vertical de *T. cruzi* (Sesti-Costa *et al.*, 2012; Kaplinski *et al.*, 2015) y en el control post-tratamiento en pacientes en fase crónica de la enfermedad (Álvarez *et al.*, 2016).

4.3. Diagnóstico serológico

La detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* mediante métodos serológicos, es una de las principales herramientas de diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Entre las técnicas convencionales se encuentran: IFI (inmunofluorescencia indirecta), HAI (hemaglutinación indirecta) y el ELISA (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas), que emplean parásitos completos o fracciones antigénicas complejas o semipurificadas de epimastigotes de *T. cruzi* (forma no infectiva del parásito). Estos métodos serológicos convencionales son altamente sensibles, pero presentan reacciones cruzadas con anticuerpos frente a otras patologías (leishmaniasis visceral y mucocutánea, malaria, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis...).

La técnica de ELISA permite observar la presencia de anticuerpos antiinmunoglobulinas conjugados a una enzima que en presencia de su sustrato produce un producto con color. Por ser una prueba colorimétrica el resultado es definido por la lectura de la absorbancia o densidad óptica.

En el método IFI, los anticuerpos presentes en el suero del paciente infectado con *T. cruzi* son colocados sobre una lámina que contiene el antígeno (formas epimastigotes de *T. cruzi*) y son revelados a través de anticuerpos anti-inmunoglobulina humana unidos a fluoresceína. El resultado se visualiza en microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta. Esta técnica puede presentar reacciones cruzadas con otros parásitos como *Leishmania spp* o *Trypanosoma rangeli*.

En la HAI, la superficie de los hematíes son sensibilizados con antígenos de *T. cruzi* adsorbidos y en presencia de los anticuerpos contra el parásito presentes en el suero del paciente se produce una reacción antígeno–anticuerpo que genera la aglutinación de los eritrocitos, la cual puede ser visualizada a simple vista.

Las técnicas serológicas no convencionales son aquellas que utilizan antígenos purificados, recombinantes o péptidos sintéticos; éstas presentan la ventaja de ser más específicas. Dentro de este conjunto de nuevas técnicas tenemos las pruebas rápidas inmunocromatográficas, éstas pueden presentar varios formatos, el denominado «casete» o en forma de tiras diagnósticas, que son capaces de proporcionar el resultado en 10-15 min. Estas pruebas funcionan con una cantidad mínima de sangre (sangre total, plasma o suero) y tienen la ventaja de que no requieren personal entrenado ni equipamiento externo, pero presentan una menor sensibilidad. Otra técnica que emplea antígenos recombinantes es el inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA), en el que se utilizan 4 antígenos recombinantes de *T. cruzi* (FP3, FP6, FP10 y TcF) unidos a micropartículas magnéticas. Esta técnica ha sido empleada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas y ha demostrado tener una elevada sensibilidad (Iborra-Bendicho *et al.*, 2012).

Pese a los avances en este campo, actualmente no se dispone de técnicas serológicas con un 100% de sensibilidad y especificidad, por ello actualmente la OMS recomienda confirmar el diagnóstico mediante el empleo de dos técnicas que utilicen principio antigénico diferente. Un problema que habitualmente se plantea con la serología durante la fase crónica es la obtención de resultados discordantes, indeterminados o no concluyentes. Este problema de discordancia de resultados entre técnicas aparece cuando los títulos serológicos son bajos, cercanos al umbral de positividad. En los casos en los que existan discordancias entre dos técnicas serológicas, se deberá recurrir a una tercera técnica para confirmar el resultado.

4.4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita

El diagnóstico de la infección congénita representa un gran reto en países no endémicos debido a que la mayoría de los recién nacidos infectados son asintomáticos o presentan signos inespecíficos. Es por tanto necesario realizar un cribado de los niños recién nacidos de madre seropositiva mediante técnicas parasitológicas y serológicas. El diagnóstico se basa en el empleo de técnicas parasitológicas, microhematocrito, antes de los seis meses de vida o mediante serología a partir de los 9-12 meses de vida (cuando

se ha producido el aclaramiento de los anticuerpos maternos). Hay autores que recomiendan el seguimiento hasta los 12 meses para confirmar el diagnóstico e iniciar tratamiento (Brutus *et al.*, 2010; De Rissio *et al.*, 2010); otros consideran que no se debe esperar hasta los 12 meses para confirmar el diagnóstico si se visualiza el parásito mediante microscopia (Carlier *et al.*, 2011).

En cuanto a las técnicas serológicas, la detección de IgG específica frente a *T. cruzi* no permite realizar el diagnóstico hasta los 9- 12 meses de vida. Además, los resultados obtenidos mediante la detección de IgM específica frente a *T. cruzi* en el recién nacido son controvertidos (Schijman *et al.*, 2003; Flores-Chávez, M *et al.*, 2007). En el trabajo realizado por Rodríguez *et al.* (2005) describe que la detección de IgM específica frente a *T. cruzi* no es una técnica adecuada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, dado que estas inmunoglobulinas podrían secretarse en respuesta a antígenos de *T. cruzi* que atraviesan la placenta.

La baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas convencionales (microhematocrito, hemocultivo) (Russomando *et al.*, 1998; Mora *et al.*, 2005), conlleva la necesidad del seguimiento hasta los 12 meses para la confirmación del diagnóstico. Muchos de los niños no completan este período de seguimiento, lo que contribuye a un aumento del infradiagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Salas *et al.*, 2007; Romero *et al.*, 2011). Siendo fundamental implementar técnicas más sensibles como la PCR y que nos permitan llevar a cabo un diagnóstico precoz. Actualmente, hay varios autores que proponen la PCR como técnica de referencia para el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* (Virreira *et al.*, 2007; Velázquez *et al.*, 2014), haciendo hincapié en la necesidad de la estandarización de esta técnica para el diagnóstico de la infección congénita.

Recientemente, también han sido descritas técnicas serológicas no convencionales basadas en la detección de anticuerpos específicos frente a proteínas recombinantes de *T. cruzi* que se están empleando en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Volta *et al.*, 2015; Concha Valdez *et al.*, 2016) .

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS		
	AGUDA	CRÓNICA	CONGÉNITA
GOTA FRESCA	+	-	+
GOTA GRUESA	++	-	++
CONCENTRACIÓN: MICROHEMATOCRITO/ STROUT	+++	+/-	+++
HEMOCULTIVO	++	+/-	++
XENODIAGNÓSTICO	++	+	++
PCR	++++	++	++++
PRUEBAS SEROLÓGICAS (HA,IFI,ELISA)	_*	++++	_**

Tabla I.2. Utilidad de las diferentes técnicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas según la fase clínica de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. Signo (+) indica que la prueba es útil, el signo (-) que no es útil y el signo (+/-) utilidad relativa. * En la fase aguda la serología es negativa, aparece IgG frente *T. cruzi* a partir de los 20 días de la infección. ** La serología no es de utilidad en la infección congénita, ya que, en el recién nacido la IgG frente *T. cruzi* son de origen materno hasta los 9-12 meses.

5. Cribado

España es el país europeo con la mayor carga de enfermedad de Chagas (Navarro *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2013). Además, se estima que podría haber un 90% de infradiagnóstico de esta enfermedad en nuestro país. Por tanto, la mayoría de población infectada desconoce el potencial riesgo de entrar en la fase crónica sintomática de la enfermedad, así como, el riesgo en las mujeres embarazadas infectadas de transmitir la enfermedad a sus descendientes.

Desde el año 2005, la legislación Española establece la necesidad de realizar un cribado universal en todos los donantes con riesgo de estar infectados por *T. cruzi*. Entre estos incluye a personas nacidas en áreas endémicas, nacidas de madre nativa de zona endémica y aquellos que han recibido una transfusión o han pasado largos períodos de tiempo (un mes o más en áreas rurales principalmente) en área endémica. Además, en 2008, se publicó el Plan Nacional de Sangre de Cordón por la Organización Nacional de Trasplantes dónde se recogen las mismas recomendaciones para todo donante en riesgo de estar infectado.

La transmisión vertical de la infección continúa siendo un problema en nuestro país. Actualmente, no existe un programa nacional para controlar esta vía de transmisión. Los programas de control de la enfermedad de Chagas congénita dependen de distintas iniciativas autonómicas. La primera comunidad en introducir un programa de cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres latinoamericanas embarazadas y sus recién nacidos fue la Comunidad Valenciana en 2007, posteriormente se sumaron a esta iniciativa Cataluña y Galicia. En otras comunidades como Madrid, País Vasco o Murcia existe un documento de recomendación, pero no un protocolo. En el caso de la Región de Murcia el documento consenso es el Programa Integral de Atención a la Mujer (PIAM), donde además de las serologías habituales realizadas durante el embarazo, se recoge la recomendación de realizar la serología frente a la enfermedad de Chagas a toda mujer que provenga de países endémicos o hijas de madre originaria de Latinoamérica.

Recientemente se ha realizado un estudio que evalúa la eficacia de implementar un programa nacional de cribado de la enfermedad de Chagas en la población latinoamericana residente en España y su descendencia, analizando 4 posibles estrategias:

1. No realizar cribado.
2. Realizar el cribado a las madres latinoamericanas embarazadas y sus niños en caso de resultar éstas infectadas.
3. Extender el cribado a los familiares de la mujer embarazada, si ésta resulta estar infectada.
4. Realizar el cribado a las madres y los niños y a los familiares de la madre aunque ésta resulte no estar infectada.

Al evaluar estas cuatro estrategias se concluye que el cribado de la enfermedad de Chagas en España es una medida coste efectiva. No realizar un cribado de la enfermedad de Chagas no es aceptable desde el punto de vista social ni sanitario. Considerando que la estrategia de extender el cribado a los familiares de la mujer embarazada infectada, además de a la madre y al niño, es la estrategia más eficiente; incluso extender el cribado a los familiares de la mujer embarazadas aunque esta resulte no estar infectada, sería una medida coste efectiva en el casos de una población con una elevada incidencia de la enfermedad, como es la población boliviana (Sicuri *et al.*, 2011; Imaz-Iglesia *et al.*, 2015).

6. Tratamiento

Actualmente solo se dispone de dos fármacos eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, beznidazol y nifurtimox; aunque no han sido aprobados por la FDA (Agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos), pueden ser obtenidos a través de la CDC (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos) (Bern, 2015). En España se tramita su obtención a través de medicación extranjera.

El beznidazol, derivado nitroimidazólico, se considera el tratamiento de primera línea, al presentar menos efectos adversos que el nifurtimox y un mayor número de estudios que avalan su eficacia (Bern *et al.*, 2007). Sin embargo, la tolerancia de cada individuo a estos medicamentos puede ser variable, en caso de intolerancia a uno de estos medicamentos se podría utilizar el otro como alternativa. La dosis recomendada para el beznidazol en adultos es de 5 a 7 mg/kg/ día en 2 o 3 tomas durante 60 días, y en niños (hasta 10 años) es de 10 mg/kg de peso y día en 2 dosis durante 60 días. En el caso del nifurtimox la dosis diaria aconsejada para el adulto es de 8 a 10 mg/kg, para los adolescentes es de 12,5 a 15 mg/kg y para los niños de 1 a 10 años es de 15 a 20 mg/kg. El fármaco se administra por vía oral en 4 tomas diarias durante 90 días.

Beznidazol y nifurtimox presentan características similares, ambos medicamentos se caracterizan por tener una buena tolerancia en niños, una mayor efectividad durante la fase aguda de la enfermedad, mayor toxicidad en adultos. Además, se ha descrito que la

eficacia de ambos fármacos varía frente a las diferentes UDTs de *T. cruzi*, puesto que algunas UDTs son intrínsecamente resistentes a los compuestos nitrogenados heterocíclicos (Toledo *et al.*, 2004). La principal limitación de ambos medicamentos 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 muchos casos la suspensión del tratamiento.

Los efectos adversos asociados con mayor frecuencia al tratamiento con benznidazol son de tipo dermatológico, principalmente dermatitis por hipersensibilidad que puede ser tratada con el uso de antihistamínicos. Pero también se puede llegar a producir una dermatitis exfoliativa, severa o dermatitis asociada a fiebre y linfadenopatías, en cuyo caso se debe detener el tratamiento. Hasta en un 30% de los pacientes pueden sufrir una neuropatía periférica dosis dependiente que revierte al detener el tratamiento. La mielosupresión es un efecto adverso raro pero implica la rápida interrupción del tratamiento. Otro de los efectos adversos que se pueden producir es la intolerancia digestiva (náuseas y dolor abdominal).

Las reacciones adversas descritas con mayor frecuencia en pacientes en tratamiento con nifurtimox son gastrointestinales: anorexia, pérdida de peso, vómitos y náuseas. Este fármaco también puede producir alteraciones neurológicas: irritabilidad, insomnio, desorientación y temblores. Otras reacciones adversas a nifurtimox más graves aunque menos comunes son las neuropatías, las parestesias y la neuritis periférica. La neuropatía periférica, es una reacción adversa dosis dependiente y su aparición implica la interrupción inmediata del tratamiento.

Los niños constituyen una cohorte especial, ya que en esta población ambos fármacos son bien tolerados, siendo muy rara la aparición de reacciones adversas (Altcheh *et al.*, 2014). El tratamiento frente a *T. cruzi* en la enfermedad de Chagas aguda y en la enfermedad de Chagas congénita ha demostrado reducir la gravedad de los síntomas, el curso de la enfermedad y la parasitemia. El tratamiento en la enfermedad de Chagas congénita, sobre todo cuando se administra precozmente (antes del año de vida), provoca una tasa de curación próxima al 100% (Altcheh *et al.*, 2010; Carlier *et al.*, 2011).

A pesar de que en la fase crónica de la enfermedad la tasa de curación es mucho menor (del 8 al 40%), el tratamiento disminuye la progresión hacia la cardiopatía y la mortalidad (Viotti *et al.*, 2006; Villar *et al.*, 2014). Actualmente, ésta indicado ofertar el tratamiento a todos los pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas, excepto aquellos mayores de 50 o 55 años y aquellos que presenten una cardiopatía irreversible.

El tratamiento de la infección por *T. cruzi* está recomendado en casos de infección aguda, infección congénita, reactivaciones y niños menores de 18 años. También se debe ofrecer el tratamiento a los adultos entre 19 y 50 años con enfermedad de Chagas crónica, sin cardiopatía avanzada. En adultos mayores de 50 años es opcional, puesto que el riesgo de toxicidad es mayor que en los pacientes jóvenes. En caso de insuficiencia renal (aclaramiento renal [Clcr] <11), se debe dar la dosis mínima y en la lactancia se debe evitar por falta de evidencia para su administración durante este período. El tratamiento está contraindicado en los pacientes con insuficiencia hepática severa, formas avanzadas de la enfermedad de Chagas y en la mujer embarazada (Bern *et al.*, 2007; Sosa-Estani *et al.*, 2012; Roca *et al.*, 2015). En la tabla I.3 se muestran las recomendaciones del tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas (Bern *et al.*, 2007).

La elevada toxicidad de los únicos dos fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, así como la menor efectividad de los mismos en la fase crónica de la enfermedad ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos fármacos con actividad tripanocida (Muñoz *et al.*, 2011; Pérez-Molina *et al.*, 2015). Algunos de los fármacos que han sido propuestos, aunque actualmente solo han sido probados en modelos murinos son los inhibidores de la cruzipaína, la anfotericina B y el alopurinol. Los inhibidores de la biosíntesis del colesterol -posaconazol o itraconazol- han sido sometidos a ensayos clínicos, pero en monoterapia han mostrado no ser eficaces para el tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica (Molina *et al.*, 2014). Se están estudiando combinaciones de estos fármacos que puedan incrementar su eficacia. Por lo tanto, actualmente la investigación de nuevos fármacos con actividad frente a *T. cruzi* sigue siendo una prioridad.

Tabla I.3. Recomendaciones para el tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas.

Tratamiento de la enfermedad de Chagas

Siempre se debe ofrecer en:

- Infección aguda por *T. cruzi*
- Infección congénita por *T. cruzi*
- Niños ≤ 12 años con infección por *T. cruzi*
- Niños de 13-18 años con infección por *T. cruzi*. Reactivación de *T. cruzi* en pacientes VIH u otras inmunosupresiones

Por lo general se ofrece:

- Mujeres en edad fértil
- Adultos de 19 a 50 años con forma indeterminada o cardiopatía leve o moderada (Kuschnir grado 0, I, o II)

Tratamiento opcional en:

- Adultos de más de 50 y sin cardiopatía avanzada (Kuschnir grado 0, I, o II)
- Pacientes con enfermedad de Chagas gastrointestinal, sin cardiopatía avanzada*

En general no se debe ofrecer tratamiento en:

- Miocardopatía chagásica avanzada con insuficiencia cardíaca congestiva (Kuschnir grado III)
- Megaesófago con deterioro significativo de la deglución

Nunca se debe ofrecer el tratamiento:

- Durante el embarazo
- Insuficiencia renal y/o hepática

*No hay datos que sugieran que el tratamiento afecte a la progresión de la forma gastrointestinal de la enfermedad. La decisión de recomendar el tratamiento debe basarse en disminuir el riesgo de que la enfermedad progrese hacia la forma cardíaca.

Fuente: adaptada de Bern *et al.* (2007)

7. Control y prevención

Las estrategias de prevención y control de la enfermedad de Chagas se centran en interrumpir la transmisión y lograr que la población infectada y enferma tenga acceso temprano a la asistencia sanitaria.

No se dispone de una vacuna eficaz para prevenir la transmisión. Las medidas adoptadas se han centrado fundamentalmente en interrumpir la transmisión vectorial en

las zonas endémicas de América latina y en el cribado de los donantes de sangre y órganos.

La enfermedad de Chagas es una zoonosis, y su erradicación es difícil, ya que, no implica únicamente la eliminación del vector sino también de los reservorios. Los Estados Miembros de la OMS se comprometieron en una resolución adoptada en la Asamblea Mundial de la Salud de 1998 a detener la transmisión de la enfermedad de Chagas para 2010. Aunque este objetivo no se ha logrado se han realizado grandes avances. Se han llevado a cabo iniciativas intergubernamentales entre los países más afectados, concretamente son 4 las iniciativas que se han llevado a cabo para el control vectorial: la Iniciativa del Cono Sur en 1991, que reúne a los ministerios de salud de Argentina, Brasil, Chile, el Estado Plurinacional de Bolivia, Paraguay y Uruguay; la Iniciativa de la Comunidad Andina en 1997; Iniciativa de América central y México en 1998; y la Iniciativa Amazónica en 2004. Las medidas adoptadas han ido encaminadas a la mejora de las viviendas, la educación sanitaria, campañas de fumigación y el cribado de los donantes de sangre. Con estas iniciativas la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas ha disminuido notablemente, del año 1990 al año 2006, se produjo una disminución global de la mortalidad estimada atribuible a la enfermedad de Chagas de 45.000 a 12.500 muertes al año, del número de nuevos casos al año de 700.000 a 41.200 y de la población en riesgo de 100 millones a 28 millones de personas (Moncayo y Silveira, 2009). Además, se ha certificado la interrupción vectorial en Uruguay (en 1997) y en Chile (1999) (Abad-Franch *et al.*, 2013).

A pesar de la disminución de la incidencia de la enfermedad de Chagas en los países endémicos, el aumento de la migración, ha provocado un aumento de la prevalencia de esta infección globalmente. Se ha puesto de manifiesto la importancia de implementar medidas de prevención y control de la enfermedad en países no endémicos, principalmente a través del cribado sangre y órganos, así como, la vía transmisión vertical, que actualmente se ha convertido el principal objetivo de los programas de control y prevención en áreas no endémicas.

En Europa no existe una legislación que regule el cribado de la mujer embarazada que provenga de áreas endémicas de la enfermedad de Chagas, ni el seguimiento de sus descendientes, excepto en tres comunidades autónomas españolas (Valencia, Cataluña y Galicia) y una región de Italia (la Toscana). En otras zonas, se han implementado

iniciativas regionales, aunque no son recomendaciones oficiales y en otros países no se dispone actualmente de ningún programa de cribado (Requena-Méndez *et al.*, 2014) (figura I.10).

El control y prevención de la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas se basa en el cribado de la mujer latinoamericana embarazada, que nos permite diagnosticar y tratar precozmente a los niños infectados y de esta manera curarlos. Recientemente, el tratamiento de la mujer en edad fértil ha sido propuesto como medida de prevención de la transmisión vertical de *T. cruzi*, ya que, hay varios trabajos que describen que las mujeres que han sido tratadas antes del embarazo, no transmiten la infección al recién nacido (Murcia *et al.*, 2013; Fabbro *et al.*, 2014; Moscatelli *et al.*, 2015).

En términos generales y según la zona geográfica, la OMS recomienda los siguientes métodos de prevención y control (OMS, 2017):

- Rociamiento de las casas y sus alrededores con insecticidas.
- Mejora de las viviendas para prevenir la infestación por el vector.
- Medidas preventivas personales, como el empleo de mosquiteros.
- Buenas prácticas higiénicas en la preparación, el transporte, el almacenamiento y el consumo de los alimentos.
- Cribado sangre y órganos.
- Cribado de los recién nacidos y niños de las madres infectadas, para diagnosticar y tratar precozmente el problema.

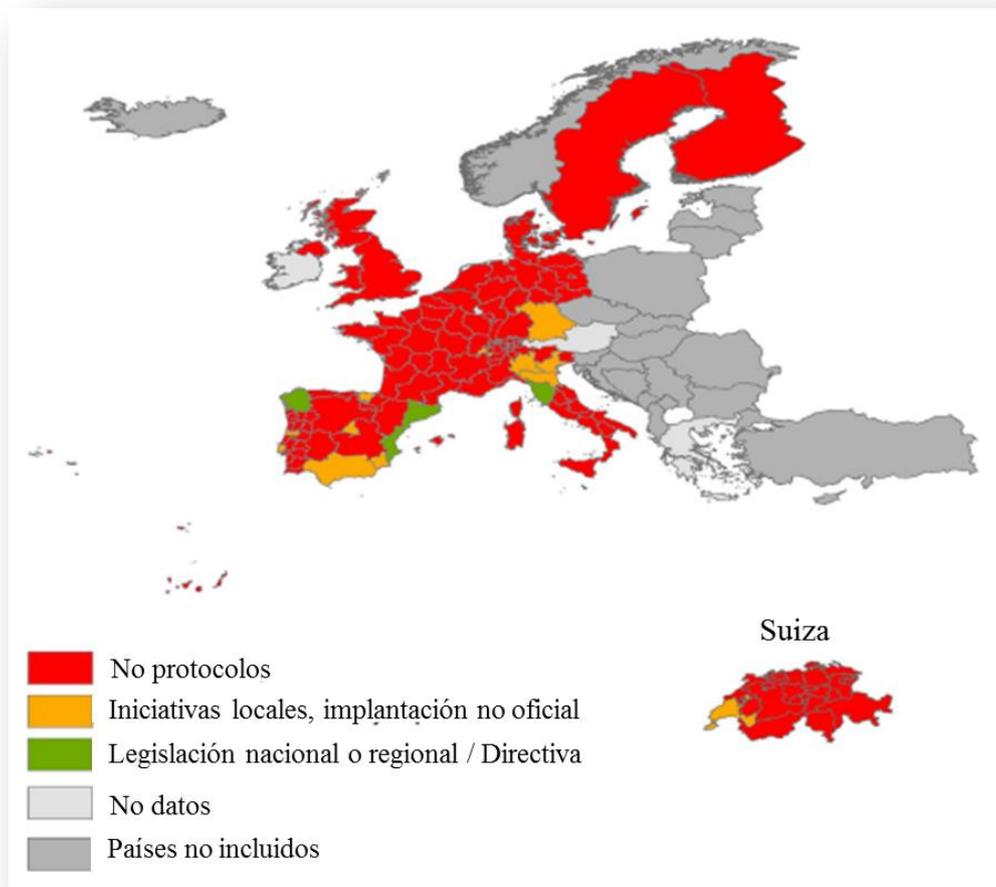


Figura I.10. Control de la transmisión congénita por *T. cruzi* en los países de la Unión Europea y Suiza. Fuente: adaptada de Requena-Méndez *et al.* (2014).

II. OBJETIVOS

En áreas no endémicas de la enfermedad de Chagas la principal vía de transmisión de la infección por *T. cruzi* es la transmisión vertical. La infección puede producirse de una generación a otra, lo cual permite la propagación incontrolada de la enfermedad de Chagas en los países desarrollados.

Concretamente, en la Región de Murcia, actualmente residen unas 48.000 personas procedentes de América del Sur, lo que constituye el 3,3% de la población total de la Región. De ellas, 16.300 son mujeres sudamericanas en edad fértil, el 25% de origen boliviano (CREM., 2016), lo que constituye un potencial foco de transmisión de la enfermedad.

El control y prevención de la enfermedad de Chagas en áreas no endémicas, como es nuestra región, se centra en el abordaje de la vía de transmisión vertical. El cribado de la mujer latinoamericana embarazada constituye la principal medida de control. En la región de Murcia se lleva a cabo mediante la iniciativa regional PIAM (Programa Integral de Apoyo a la Mujer).

Es importante dilucidar aquellos factores que puedan estar implicados en la transmisión vertical de *T. cruzi*, para adoptar las medidas necesarias para su prevención. Constituyendo el tratamiento de la mujer en edad fértil una de las medidas propuestas para la prevención de la transmisión materno-fetal de la infección.

La transmisión postnatal de *T. cruzi* a través de la lactancia materna se ha postulado como una vía alternativa de transmisión de la enfermedad, dado que esta posible vía de infección es prevenible, es importante esclarecer su papel en la transmisión.

Otro de los retos a los que nos enfrentamos en los países no endémicos, es el diagnóstico de la enfermedad Chagas congénita, ya que, la mayoría de los recién nacidos infectados son asintomáticos. Siendo necesario el cribado de los niños recién nacidos de madre seropositiva. Actualmente, las técnicas diagnósticas de las que disponemos no alcanzan una buena sensibilidad, ni permiten un diagnóstico precoz de la enfermedad. Esto hace que se plantee la necesidad de incorporar nuevas técnicas moleculares como la PCR, que permitan la detección precoz de la infección congénita.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es el estudio de los factores de riesgo prenatales, perinatales y postnatales implicados en la transmisión vertical de la

infección por *T. cruzi*, así como, el tratamiento de la mujer en edad fértil como medida de prevención primaria de la transmisión. También se evalúa la utilidad de la técnica de PCR en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita. Estos objetivos generales se concretan en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de los factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas. Análisis de datos epidemiológicos y estado parasitológico de las madres durante el embarazo.
2. Determinar la utilidad del tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida de prevención primaria.
3. Valorar la lactancia materna como posible vía de transmisión de *T. cruzi*.
4. Evaluación de técnicas serológicas, parasitológicas y moleculares para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas congénita.
5. Evaluar la importancia del tratamiento precoz de los recién nacidos con infección congénita por *T. cruzi*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras clínicas

A todas las madres y niños en seguimiento se les tomó muestra de suero y sangre total. Además durante el estudio también se tomaron muestras de leche materna, placenta y codón umbilical.

Suero: se extrajo 5 ml de sangre tanto a las madres como a los niños, en un tubo sin anticoagulante para la realización de los estudios serológicos (material y métodos, apartado 3).

Sangre periférica: se extrajo aproximadamente 10 ml de sangre a las madres y 2 ml a los recién nacidos en presencia de EDTA como anticoagulante. Aproximadamente 0.5 ml de sangre del recién nacido se utilizó para la realización del microhematocrito (material y métodos, apartado 2). Mientras que el resto de sangre del recién nacido y los 10 ml de sangre de la madre se mezcló con igual volumen de solución de lisis que contiene una solución de hidrócloruro de guanidina 6 M (preservante y desnaturizante de enzimas) y EDTA 200 mM (anticoagulante) a pH 8 y se conservó a 4°C (Wincker *et al.*, 1994), para abordar los estudios de detección del parásito por técnicas moleculares (material y métodos, apartado 4).

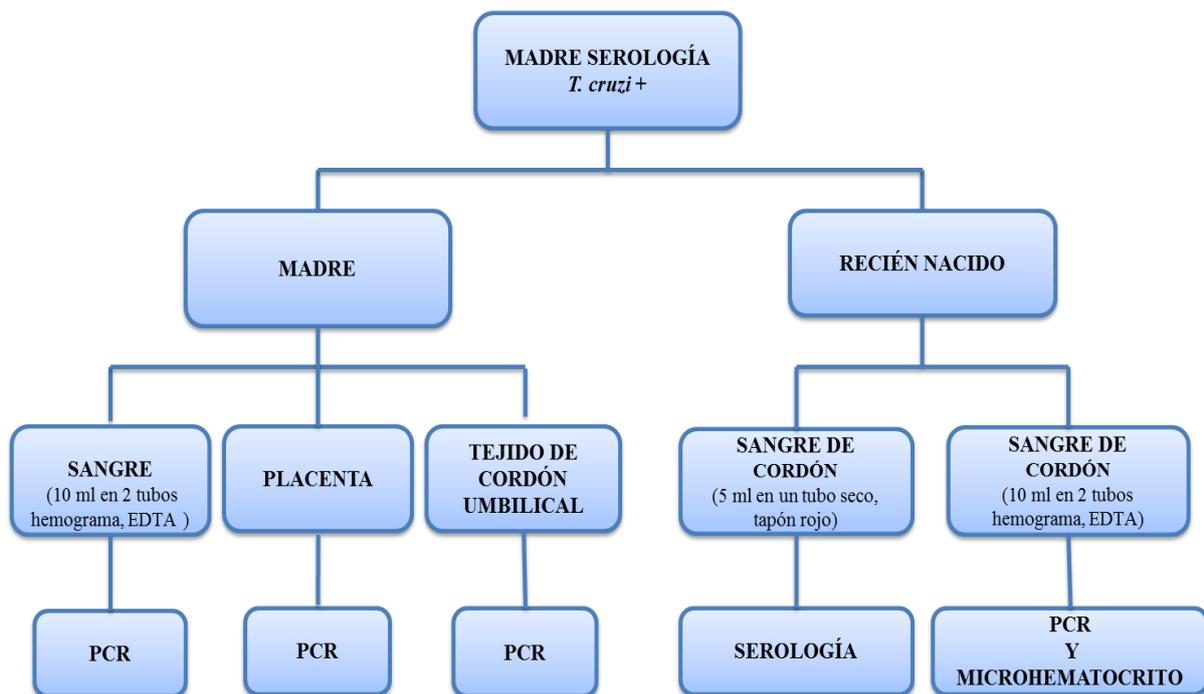
Leche materna: A las madres en proceso de lactancia se les tomó una muestra de aproximadamente 10 ml de leche, se realizaron tres alícuotas: una de ellas se mezcló con el mismo volumen de solución de lisis hidrócloruro de guanidina 6 M y EDTA 200 mM (se procesó de la misma forma que la sangre periférica) y se conservó a 4°C y las otras dos alícuotas sin buffer de lisis se conservaron a -20°C, para la detección de *T. cruzi* mediante PCR en leche materna (material y métodos, apartado 4).

Sangre de cordón: En los casos en los que se realizó el protocolo de paritorio en gestante con enfermedad de Chagas, se tomó una muestra de sangre de cordón del recién nacido para el estudio de la enfermedad de Chagas por técnicas serológicas y parasitológicas (protocolo paritorio en gestante con enfermedad de Chagas, figura III.1).

Placenta y codón umbilical: En el momento del parto se recogió un fragmento de cordón umbilical y de placenta que se remitió en un recipiente estéril por separado al laboratorio del HCUVA (protocolo paritorio en gestante con enfermedad de Chagas,

figura III.1). El tejido fresco (sin congelar), se colocó en 5 a 10 volúmenes (10 ul de solución por 1mg de tejido) de RNAlater® Solution (Applied Biosystems, Foster City, CA). Las muestras se dejaron una noche a 4°C (para permitir que la solución penetrara lentamente en el tejido), luego se conservaron -20°C para la posterior realización de estudios moleculares (material y métodos, apartado 4).

Figura III.1. Protocolo paritorio en gestante con enfermedad de Chagas.



2. Técnicas parasitológicas: microhematocrito

Es una técnica de concentración que mejora el redimiendo de la microscopía convencional, para su realización se requiere de 0.5 a 1 ml de sangre periférica de los recién nacidos.

La técnica consiste en concentrar los parásitos de la muestra de sangre recogida en los tubos capilares heparinizados por centrifugación. Los elementos de la sangre se separan por gradiente de densidad. Los glóbulos rojos se concentran en la parte inferior

del capilar, el plasma queda en la parte superior (zona líquida y transparente) y en la interfase, encontramos un anillo blanquecino de 1 mm de altura formado por los glóbulos blancos donde se visualizará el parásito en caso de estar presente.

Para realizar esta técnica los capilares se centrifugaron durante dos minutos a 5.000 rpm en una microcentrifuga. Posteriormente se colocaron sobre un portaobjetos (se sujetó con cinta adhesiva) y se observó el movimiento de los parásitos en la interfase entre el empaquetado de hematíes y el plasma (capa de leucocitos) con el microscopio óptico a 400x.

3. Técnicas serológicas

El diagnóstico de enfermedad de Chagas se estableció en base a los criterios de la OMS. Para ello, se utilizaron dos técnicas serológicas que emplean diferentes antígenos-IFI (CHAGAS IFI IgG+IgM®, Vircell, España) y CMIA (ARCHITECT Chagas®, Abbott, Alemania)- siguiendo las instrucciones del fabricante. Aquellos pacientes con resultado positivo para ambas técnicas se consideraron infectados por *T. cruzi*. En la inmunofluorescencia indirecta (IFI), se utilizan epimastigotes de *T. cruzi*, obtenidos de cultivo y fijados en portaobjetos, sobre los que se realiza la reacción antígeno-anticuerpo. En el inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) se utilizan antígenos recombinantes de *T. cruzi* unidos a micropartículas magnéticas.

3.1. 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.

Antes de iniciar la determinación, se atemperaron los componentes del kit durante 30 minutos. Se preparó el buffer fosfato salino (PBS) y las diluciones de los sueros en PBS (1/80 y 1/160). Las áreas reactivas del portaobjetos se cubrieron con las muestras diluidas y los controles y, a continuación, los portaobjetos se incubaron durante 30

minutos en una cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras realizar un lavado rápido con PBS, se llevaron a cabo dos lavados sucesivos de 5 minutos cada uno colocando los portaobjetos en el vaso de Coplin que contenía PBS, agitando suavemente. Los portaobjetos se secaron sacudiendo el exceso de PBS sobre papel absorbente manteniendo húmedas las áreas reactivas, sobre las que se añadió la antiglobulina, incubándose durante 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente. Tras el lavado de los portaobjetos con PBS, las áreas reactivas se cubrieron con azul de Evans 0,1%, incubándose durante 4 minutos en la cámara húmeda a temperatura ambiente. El exceso de colorante se lavó con cuidado con PBS, colocándose rápidamente el medio de montaje y el cubreobjetos, evitando la formación de burbujas. Las preparaciones se observaron inmediatamente en el microscopio de fluorescencia (Olympus U-RFLT50).

Los controles positivos y negativos suministrados por el fabricante se incluyeron en el ensayo. Para la validación de cada ensayo se comprobó que los resultados de los controles fuesen correctos. Títulos de $IFI \geq 1/80$ se consideraron positivos.

El título del suero vendrá dado por la máxima dilución a la que se observe una reacción positiva. Una reacción positiva será aquella en la que se observe fluorescencia periférica, citoplasmática y flagelar.

3.2. Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)

El inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) (ARCHITECT Chagas®, Abbott, Alemania) se realizó empleando el sistema ARCHITECTi2000SR (Abbott). Es una prueba cualitativa totalmente automatizada para la detección de anticuerpos IgG frente a *T. cruzi*.

Brevemente, se trata de un procedimiento que en un primer paso combinó la muestra y el diluyente de la misma. Posteriormente, se añadieron 4 antígenos recombinantes de *T. cruzi* (FP3, FP6, FP10 y TcF) (Chang *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007) unidos a micropartículas magnéticas.

Después de un lavado, las muestras se incubaron con los anticuerpos murinos anti-IgG humana marcados con acridinio. Tras otro ciclo de lavado, se añadieron las soluciones “pre-trigger” y “trigger”.

El resultado de la reacción quimioluminiscente se midió como unidades relativas de luz (RLUs). Existe una relación directa entre la cantidad de anticuerpos frente a *T. cruzi* en la muestra y las RLUs detectadas. Los resultados se representaron como un ratio entre la señal de la muestra (en RLUs) y el valor del punto de corte (S/CO), donde valores de S/CO > 1 se consideraron como positivos, valores de S/CO > 0.8 a 0.99 se consideraron indeterminados zona gris, y valores S/CO < 0.8 se consideraron negativos.

4. Técnicas moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

4.1. Extracción del ADN

El ADN se purificó usando el kit Maxwell 16 Blood DNA Purification (Promega Biotech Iberica), basado en la extracción de ácidos nucleicos mediante la utilización de partículas magnéticas.

La extracción del ADN se realizó en muestras de sangre, leche materna, cordón umbilical y placenta.

En las muestras de sangre, la mezcla -solución guanidina -HCl 6M/EDTA 0,2M se conservó a 4°C (24-48 horas) hasta el momento de la extracción del ADN. Antes de proceder a la extracción del ADN, dicha mezcla se sometió a un baño de agua en ebullición durante 15 min para favorecer la ruptura del DNA del minicírculo (Britto *et al.*, 1993). La extracción del ADN de las muestras de sangre se realizó por duplicado (Murcia *et al.*, 2010). Se emplearon 400 µL de la muestra, previamente procesada como se ha descrito anteriormente. La elución se realizó en un volumen final de 250 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el caso muestras de leche, la extracción de ADN se realizó de 3 maneras diferentes en las alícuotas obtenidas. Una de las alícuotas sin solución de lisis conservada a -20°C se extrajo directamente. Las otras dos alícuotas, sin solución de lisis conservada a -20°C y la que contenía guanidina -HCl 6M/EDTA 0,2M conservada a 4°C, se sometieron a un proceso de ebullición durante 15 min antes de la extracción.

El ADN se purificó usando el kit Maxwell 16 tissueDNA Purification (Promega Biotech Iberica). Se partió de un volumen de 400 µL de la muestra y la elución se realizó en un volumen final de 250 µL, siguiendo las instrucciones del fabricante.

La extracción de ADN en las muestras de placenta y cordón umbilical se realizó por triplicado, utilizando el kit Maxwell 16 tissueDNA Purification (Promega Biotech Iberica). Se partió de 200mg del tejido y la elución se realizó en un volumen final de 250 µL y el ADN extraído se cuantificó.

El ADN extraído se cuantificó utilizando un espectrofotómetro UV/visible de mono haz (Eppendorf BioPhotometer plus) en ng/µl, se determinó la calidad del ADN extraído comprobando los valores de absorbancia 260/280 nm.

4.2. Amplificación de ADN mediante PCR cualitativa

La diana utilizada fue el ADN del kinetoplasto de *T. cruzi*, para su detección se utilizaron los oligonucleótidos 121 (5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3') y 122 (5'-GTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'), que amplifican la región de 330 pares de bases (pb) del ADN del minicírculo del kinetoplasto, según el protocolo descrito por Murcia *et al.* (2010). La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 75 µL que contiene: 0.2 mM de mezcla de dNTP (Applied Biosystems), 200 ng de cada oligonucleótido 121 y 122 (SigmaAldrich), 2,5 unidades del enzima GoTaq® Hot Start Polymerase (Promega), 15 µL del 5X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 2,5 mM de cloruro de magnesio (MgCl₂) (Promega) y 10 µL de ADN extraído de cada muestra a estudio (aproximadamente, 200 ng).

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems), las condiciones de amplificación fueron: 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.

Se incluyeron controles internos de amplificación para garantizar la correcta extracción de ADN. Para esto se utilizaron los oligonucleótidos REV (5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3') y HUF (5'-GGACCGCCTGGATACCGC-3'),

cuya diana es el ADN ribosómico siguiendo el mismo protocolo de amplificación que el descrito anteriormente. La técnica también incluye como un control positivo una muestra de un paciente con resultado de PCR positivo, así como los controles negativos del proceso de extracción de ADN y de amplificación en ambas reacciones de PCR.

4.3. Técnicas electroforéticas

Para la detección de los fragmentos de ADN amplificados mediante PCR, el ADN se sometió a electroforesis en geles horizontales de agarosa (Pronadisa) a una concentración de agarosa del 2% en tampón TBE (44.5 mM Tris, 44.5 mM ácido bórico, 1 mM EDTA pH 8.4). Para la visualización del producto amplificado se utilizó el reactivo SYBR® Safe DNA Gel Stain (life technologies), compuesto fluorescente que se intercala en el DNA de doble cadena amplificado. Las electroforesis se realizó a 130mV durante 30 min.

El marcador de referencia de peso molecular utilizado para calcular el tamaño de los fragmentos amplificados, fue el marcador 100 bp DNA ladder (Invitrogen). Los geles fueron visualizados en un transiluminador de UV (U:GENIUS, Syngene).

Los procesos de extracción de ADN, amplificación mediante PCR y electroforesis en gel se realizaron en áreas de trabajo independientes con el fin de evitar la contaminación

4.4. Amplificación de ADN por PCR cuantitativa

La PCR cuantitativa se realizó utilizando sondas TaqMan, con marcajes de fluorocromos que utilizan la actividad 5' nucleasa de la Taq polimerasa de DNA para detectar un producto de PCR específico a medida que se acumula durante la PCR. El fundamento de esta técnica es el siguiente:

La diana utilizada fue el ADN del kinetoplasto 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 la región

conservada del ADN del minicírculo del kinetoplasto, según el protocolo descrito por Qvarnstrom *et al.* (2012). La reacción de amplificación de ADN se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L que contiene: 2x Taqman Universal PCR master mix (Applied Biosystems), 0.4 mM de cada uno de los cebadores 32F y 148R, 0.1 mM 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 5 μ L de cada muestra de ADN extraída.

La sonda LNA TaqMan es una sonda con nucleótidos modificados que le confieren a la sonda 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 T_m (Temperatura de "melting") alta. Y los fluoróforos utilizados fueron: HEX como fluorocromo notificador y TAMRA como fluorocromo apantallador.

Las muestras de ADN extraídas en este caso se cuantificaron el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000, ng/ μ L. Se realizaron diluciones de las mismas hasta una concentración de 46.5ng/ μ L para poner en la reacción de PCR la misma cantidad de muestra en todos los casos. Cada muestra de ADN se analizó por duplicado.

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.

Para cuantificar la carga parasitaria se utilizó una curva estándar construida a partir de una dilución seriada de una cantidad conocida de ADN purificado de parásito, concretamente se partió de 0.01 ng/ μ L *T. cruzi*, genotipo I (el ADN fue purificado a partir de epimastigotes crecidos en cultivo celular) y se prepararon diluciones seriadas 1/10 hasta obtener 10^{-7} ng/ μ L. Cada una de las diluciones se realizó por duplicado para la obtención de una curva estándar lo más exacta posible.

En esta técnica no se utilizó control positivo, ni control interno, porque se partió de muestras de ADN extraído con resultado de PCR cualitativa positivo. Como control negativo se incluyó una determinación con la mezcla de PCR más agua.

5. Tratamiento

Las madres y los niños infectados fueron tratados con beznidazol por vía oral. Se administró 10 mg/kg de peso corporal/día en los casos pediátricos y 5-7 mg/kg peso corporal/día en las madres infectadas en tres tomas diarias durante 60 días.

Cuando los pacientes presentaron reacciones adversas a beznidazol que forzaron la suspensión del tratamiento, fueron sometidos a un segundo ciclo de tratamiento con nifurtimox. La dosis utilizada fue 10 mg/kg de peso corporal/día en dos tomas diarias durante 90 días.

Control del tratamiento

Para el estudio de la respuesta al tratamiento se analizó la parasitemia y la presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* mediante PCR y serología respectivamente. Para esto se tomaron muestras de sangre periférica y suero tanto en las madres como en los niños infectados después del tratamiento.

- En las madres los controles se realizaron a los 60-90, 150 y 240 días después del tratamiento. Tras el primer año se realizó un control anual.
- En los niños los controles se realizaron a los 60-90, 150 y 360 días después del tratamiento. En los casos en los que la serología permanece positiva tras el primer año se realizó un control anual (protocolo de diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Chagas congénita, figura III.2)

Se consideró que un paciente se había curado de la infección cuando se obtuvo un resultado de serología negativo en dos determinaciones sucesivas.

6. Población a estudio

6.1. Mujeres embarazadas o en edad fértil de origen latinoamericano

La población sujeto de estudio son las mujeres embarazadas o en edad fértil de origen latinoamericano que asistieron a control prenatal en los centros sanitarios (EAP) del Servicio Murciano de Salud (SMS). La detección de la enfermedad de Chagas se ofreció durante el primer trimestre del embarazo, o cuando las mujeres buscaron atención médica en el caso de embarazos no controlados. Todas las muestras fueron procesadas en el Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA), Murcia. El diagnóstico de laboratorio durante la fase crónica la enfermedad de Chagas se basa en dos pruebas serológicas, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2003) recomienda llevar a cabo el diagnóstico con dos pruebas serológicas en paralelo usando antígenos distintos. En nuestro estudio se emplearon las técnicas serológicas de CMIA e IFI para el diagnóstico de la infección (material y métodos, apartado 3). En los casos de discordancia entre los resultados de ambas pruebas se dispuso una técnica adicional, un test inmunocromatográfico de detección de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* (SD Bioline Chagas Ab Rapid, Standard Diagnostics, Korea)

Una vez establecido el diagnóstico de la infección, las mujeres fueron remitidas a la consulta de Medicina Tropical para su estudio y tratamiento. Se les tomó una muestra de sangre periférica para la detección de *T. cruzi* mediante PCR (material y métodos, apartado 4). Además, se les realizó una anamnesis para la recogida de los siguientes datos epidemiológicos:

- Edad
- País y departamento de origen
- Años de residencia en España
- Si habían recibido tratamiento antes de quedarse embarazadas
- Tiempo transcurrido desde que iniciaron el tratamiento hasta que se quedaron embarazadas, en el caso de haber recibido tratamiento antes del embarazo.

El tratamiento específico para la enfermedad de Chagas en gestantes sólo se ofreció después del parto y una vez que ha concluido la lactancia materna.

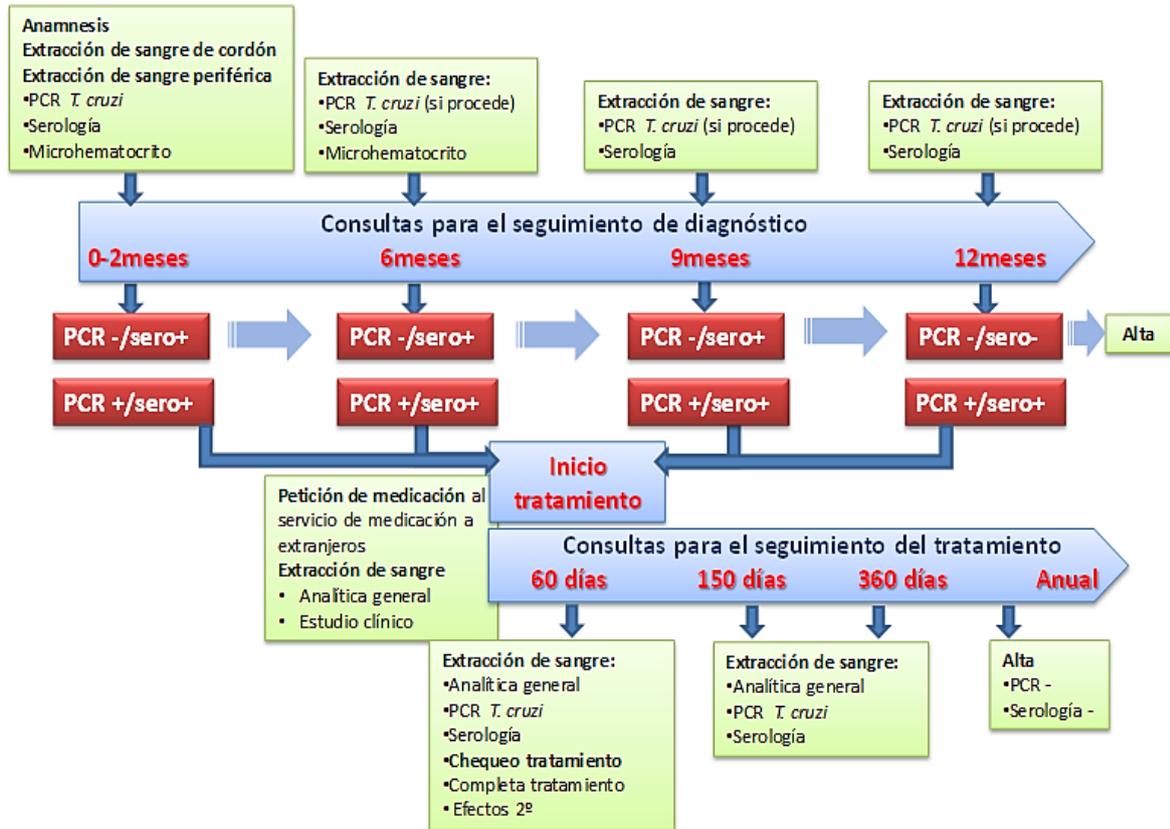
6.2. Niños de madres latinoamericanas con serología *T. cruzi* positiva.

Se realizó el seguimiento de todos los niños nacidos de madre con enfermedad de Chagas. En el protocolo diagnóstico se incluyeron las variables: serología (CMIA e IFI), examen microscópico directo de sangre en tubos de microhematocrito heparinizado y la detección de *T. cruzi* mediante PCR (protocolo de diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas congénita, figura III.2).

Los criterios diagnósticos para definir un caso como congénito fueron: recién nacido o lactante de 1 año o menos, de madre latinoamericana con serología *T. cruzi* positiva y que presentó examen microscópico o PCR positiva y/o serología positiva a los 12 meses de vida (dado que el aclaramiento de anticuerpos maternos no se produce hasta los 9-12 meses de vida). Si el recién nacido se consideró infectado se le realizó una anamnesis exhaustiva para evaluar posibles manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita y se inició tratamiento específico.

Además en el caso de diagnosticarse como congénito, la muestra de sangre con resultado de PCR positivo para *T. cruzi* fue enviada al Instituto de Parasitología López-Neyra de Granada, para realizar el cultivo y aislamiento del parásito.

Figura III.2. Protocolo de diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Chagas congénita.



6.3. Cohorte general

Esta cohorte incluyó a 144 mujeres latinoamericanas en fase crónica de la enfermedad de Chagas que acudieron a las consultas de la Unidad de Medicina Tropical del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca (HCUVA) desde enero de 2007 hasta mayo de 2016, así como sus descendientes. Se llevó a cabo la recopilación de datos clínico-epidemiológicos de las madres mediante una entrevista personal, así como el seguimiento del estado parasitológico tanto de la madre como del recién nacido mediante la detección de *T. cruzi* por PCR (material y métodos, apartado 4), con la finalidad de estudiar los factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.

De las 144 mujeres incluidas en el estudio, una de ellas dio a luz a gemelos. Además, en 12 madres se realizó el seguimiento de más de un embarazo. En concreto, 3 madres dieron a luz 3 veces y 9 madres dieron a luz 2 veces durante el período de estudio. Por tanto, se realizó el seguimiento en 159 embarazos y un total de 160 recién nacidos fueron estudiados.

De las 144 mujeres, 36 habían sido tratadas antes del embarazo y 113 no habían sido tratadas. En 5 casos no habían sido tratadas antes del primer embarazo, pero sí recibieron tratamiento antes de su segundo embarazo.

A las mujeres embarazadas que fueron diagnosticadas de infección por *T. cruzi*, se les tomó una muestra de sangre periférica durante el embarazo, principalmente en el tercer trimestre o posparto reciente, para el estudio del estado parasitológico mediante PCR de *T. cruzi*. A los recién nacidos se les tomó una muestra de suero y sangre en el momento del nacimiento (sangre de cordón) o a los pocos días de vida (sangre periférica). Cuando esto no fue posible, la muestra se tomó en el momento en el que acudieron la consulta de Medicina Tropical (en la tabla III.1 se muestra las edades de los niños a las cuales se dispuso de la primera muestra de sangre para la realización del diagnóstico).

Tabla III.1. Edad de los niños a la cual se dispuso de la primera muestra de sangre para la realización del diagnóstico.

Edad de los Niños	Muestras de sangre	
	Nº Total (n=160)	%
0 *	46	28,7
< 1 mes	61	38,1%
>1 - < 3 mes	11	6,9
> 3 - < 6 meses	16	10
> 6 - < 9 meses	6	3.8
> 9 - < 12 meses	6	3.8
> 1 año	14	8,7

*Niños de los cuales se dispuso de muestra en el momento del nacimiento, sangre de cordón.

Factores de riesgo y prevención primaria de la enfermedad de Chagas congénita

Para el diagnóstico de la infección congénita se siguió el protocolo previamente descrito (protocolo de diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Chagas congénita, figura III.2). Se realizó un estudio serológico y molecular a las 0-2, 6, 9 y 12 meses de vida en 146 niños. Mientras que en los 14 niños restantes, debido a la falta de muestra en el momento del nacimiento; el diagnóstico se realizó con más de un año de vida, considerándose en este caso infectados si presentaban anticuerpos positivos frente a *T. cruzi*.

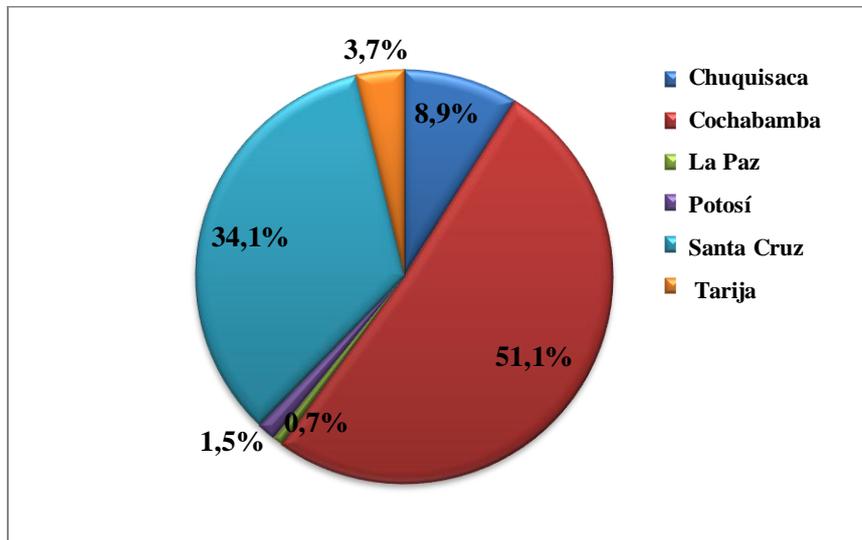
En cuanto a los datos epidemiológicos de las 144 mujeres embarazadas latinoamericanas con enfermedad de Chagas incluidas en el estudio; la mayoría de ellas, 136 (95.8%) procedían de Bolivia, 4 (2.8%) procedían de Paraguay y 2 (1.4%) procedían de Ecuador, de 2 de ellas no se disponían de los datos de país de procedencia (tabla III.2).

Tabla III.2. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas incluidas en el estudio.

País	Nº de pacientes (Nº Total= 142)	Porcentaje
Bolivia	136	95,8%
Paraguay	4	2,8%
Ecuador	2	1,4%

Se dispuso de datos de la región de procedencia de 140 de estas mujeres: las mujeres bolivianas procedían de los departamentos de Cochabamba (69; 51,1%), Santa Cruz (46; 34,1%), Chuquisaca (12; 8,8%), Tarija (5; 3,7%), Potosí (2; 1,4%) y la Paz (1; 0,7%) (figura III.3); las 2 mujeres ecuatorianas procedían de las provincias de Pichincha (ciudad Quito) y Guayas (ciudad Guayaquil), y 3 de las 4 mujeres paraguayas de las que se dispuso de datos de departamento de procedencia eran de Gauguazú, Cordillera y Alto de Paraná

Figura III.3. Departamento de procedencia de las mujeres bolivianas con enfermedad de Chagas



Debido a que durante el período de estudio 12 de las 144 mujeres presentaron varios embarazos, se realizó el seguimiento de 159 embarazos. Para estudiar la edad de las mujeres y los años de residencia en España, se recogieron los datos de cada uno de los embarazos, estudiándose en los 159 embarazos.

El rango de edad de las mujeres en los 159 embarazos fue de 15 a 45 años, siendo la media de edad igual a $31,1 \pm 5,9$ años (media \pm desviación estándar). La mayoría de las mujeres embarazadas tenían edades comprendidas entre los 26 y los 35 años de edad (tabla III.3).

Tabla III.3. Edades de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas en el momento del embarazo.

Edad	Nº de pacientes (Nº total =159)	Porcentaje
15-25 años	30	18,2%
>25-35 años	92	57,9%
>35-45 años	38	23,9%

Según los años de residencia en España, las mujeres se clasificaron en aquellas con una estancia corta en nuestro país en el momento del embarazo (< 3 años), o con una estancia prolongada (\geq 3 años); la mayoría de ellas (86.6%) llevaban más de tres años en nuestro país en el momento del embarazo (tabla III.4).

Tabla III.4. Años de residencia en España en el momento del embarazo de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas incluidas en el estudio

Años de residencia en España	Nº de pacientes (Nº total =159)	Porcentaje
< 3 años	21	13.2%
\geq 3 años	136	86.8%

Para llevar a cabo los diferentes estudios planteados en esta tesis doctoral se realizaron varios grupos a partir de esta cohorte general.

6.4. Grupo 1

De la cohorte general de estudio constituida por 144 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas se seleccionó una cohorte de 113 mujeres embarazadas latinoamericanas que no habían sido tratadas antes de quedarse embarazadas, para estudiar si durante el embarazo se produce un incremento de la parasitemia detectado mediante PCR de *T. cruzi*.

En cuanto al país de origen: la mayoría de ellas, 106 (95.5%) procedían de Bolivia, 3 (2.7%) procedían de Paraguay y 2 (1.8%) procedían de Ecuador, de 2 de ellas no se disponían de los datos de país de procedencia (tabla III.5). Se dispuso de datos de la región de procedencia de 109 de estas mujeres: las mujeres bolivianas procedían de los departamentos de Cochabamba (53; 50,5%), Santa Cruz (36; 34,3%), Chuquisaca (10; 9,5%), Tarija (4; 3,8%), Potosí (1; 1%) y la Paz (1; 01%); las 2 mujeres ecuatorianas procedían de las provincias de Pichincha (ciudad Quito) y Guayas (ciudad Guayaquil), y 2 de las 3 mujeres paraguayas de las que se dispuso de datos de departamento de procedencia eran de Cordillera y Alto de Paraná.

Tabla III.5. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas no tratadas antes del embarazo.

País	Nº de pacientes (Nº Total= 111)	Porcentaje
Bolivia	106	95,5%
Paraguay	3	2,7%
Ecuador	2	1,8%

Estas 113 mujeres durante el período de estudio tuvieron 121 embarazos, la edad de las mujeres y los años en España se estudió en los 121 embarazos.

El rango de edad de las mujeres en los 121 embarazos fue de 16 a 45 años, siendo la media de edad: $30,8 \pm 5,7$ años (media \pm desviación estándar). El 60,3% de las madres tenían edades comprendidas entre los 26 y los 35 años de edad (tabla III.6).

Tabla III.6. Edad en el momento del embarazo de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que no habían recibido tratamiento antes de quedarse embarazadas.

Edad	Nº de pacientes (Nº total =121)	Porcentaje
15-25 años	22	18,2%
>25-35 años	73	60,3%
>35-45 años	26	21,5%

La media de años en España de las mujeres no tratadas antes del embarazo fue de $6,5 \pm 3,6$ (media \pm desviación estándar). El 74,4% de ellas vivían en España desde hacía más de tres años en el momento del embarazo, mientras que el 25,6% llevaban menos de tres años viviendo en España cuando se quedaron embarazadas. De 4 de ellas no se disponían datos de años de residencia en España (tabla III.7).

Tabla III.7. Años de residencia en España en el momento del embarazo de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que no habían recibido tratamiento antes del embarazo.

Años de residencia en España	Nº de pacientes (Nº total =117)	Porcentaje
< 3 años	30	25,6%
≥ 3 años	87	74,4%

Grupo control

Como grupo control para estudiar si durante el embarazo se produce un incremento de la parasitemia detectado mediante PCR de *T. cruzi*, se incluyó una cohorte constituida por 150 mujeres latinoamericanas no embarazadas y no tratadas, en fase crónica de la enfermedad de Chagas. A todas se les realizó un estudio parasitológico mediante PCR de *T. cruzi*.

En cuanto al país de origen, 146 (97.98%) procedían de Bolivia, 1 de Paraguay, 1 de Argentina y 1 de Ecuador (de 1 de ellas no se dispuso de dato del país de procedencia) (tabla III.8). Las mujeres bolivianas procedían de los departamentos de Cochabamba (63; 44,1%), Santa Cruz (55; 38,5%), Chuquisaca (22; 15,4%), Tarija (1; 0,7%) y Potosí (2; 1,4%) (de 3 mujeres no se dispuso de datos de departamento de procedencia).

Tabla III.8. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas no embarazadas.

País	Nº de pacientes (Nº Total= 149)	Porcentaje
Bolivia	146	97,98%
Paraguay	1	0,67%
Argentina	1	0,67%
Ecuador	1	0,67%

El rango de edad de las mujeres con enfermedad de Chagas no embarazadas fue de 17 a 43 años, y la media de edad fue de 32.2 ± 5.6 años (media \pm desviación estándar). La distribución de las edades se muestra en la tabla III.9.

Tabla III.9. Edad de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas no embarazadas.

Edad	Nº de pacientes (Nº total =150)	Porcentaje
15-25 años	19	12,7%
>25-35 años	85	56,7%
>35-45 años	46	30,7%

La media de años en España de las mujeres no embarazadas fue $5,3 \pm 3,2$ (media \pm desviación estándar). El 84,9% de ellas vivían en España desde hacía más de tres años en el momento del estudio, mientras que el 15,1% llevaban menos de tres años viviendo en España. De 4 de ellas no se disponían datos de años de residencia en España (tabla III.10).

Tabla III.10. Años de residencia en España en el momento del estudio de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas no embarazadas.

Años de residencia en España	Nº de pacientes (Nº total =146)	Porcentaje
< 3 años	22	15,1%
≥ 3 años	124	84,9%

6.5. Grupo 2

Para valorar la carga parasitaria como factor de riesgo implicado en la transmisión vertical, se seleccionó una cohorte de 19 mujeres con un resultado de PCR positivo para *T. cruzi* durante el embarazo. De estas, 9 habían transmitido la infección a sus recién

nacidos. Las 19 mujeres están incluidas en el grupo 1 que incluía 113 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas no tratadas.

Se seleccionaron 9 de las 13 madres que transmitieron la infección al recién nacido, de las cuales se disponía de muestra sangre con resultado de PCR positivo próxima al momento del parto. De igual modo, se seleccionó un grupo de 10 madres no tratadas con una PCR positiva próxima al momento del parto, que no transmitieron la infección al recién nacido. A las 19 madres se les realizó la PCR cuantitativa (material y métodos, apartado 4.4) para determinar la carga parasitaria.

En cuanto a los datos epidemiológicos; las 9 mujeres que transmitieron la infección al recién nacido eran bolivianas, de los departamentos de Santa Cruz (5; 55,6%), Cochabamba (3; 33,3%) y Chuquisaca (1; 11,1%). El rango de edad de las mujeres fue de 20-38 años y la media de edad fue de $30,8 \pm 5,8$ años (media \pm desviación estándar). La media de años de residencia en España en el momento del parto fue de $6,22 \pm 2,9$ años (media \pm desviación estándar).

Las 10 mujeres que no transmitieron la infección al recién nacido eran bolivianas, de los departamentos de Santa Cruz (4; 40%), Cochabamba (5; 50%) y Chuquisaca (1; 10%). El rango de edad de las mujeres fue de 21-38 años y la media de edad de $31 \pm 5,9$ años (media \pm desviación estándar). La media de años de residencia en España en el momento del parto fue de $5,22 \pm 3,1$ años (media \pm desviación estándar).

6.6. Grupo 3

De la cohorte general de estudio constituida por 144 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas se seleccionó una cohorte de 36 mujeres embarazadas que fueron tratadas antes del embarazo, así como, sus descendientes; para evaluar si el tratamiento de la mujer en edad fértil es una medida eficaz para prevenir la transmisión vertical de *T. cruzi*.

En cuanto al país de origen: la mayoría de ellas, 35 (97.5%) procedían de Bolivia y 1 (2.8%) procedía de Paraguay (tabla III.11). Las 35 mujeres bolivianas procedían de

los departamentos de: Cochabamba (19; 54,3%), Santa Cruz (12; 34,3%), Chuquisaca (2; 5,7%), Tarija (1; 2,9%) y Potosí (1; 2,9%); y la mujer paraguaya procedía de Gaaguazú.

Tabla III.11. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que habían recibido tratamiento antes de quedarse embarazadas.

País	Nº de pacientes (Nº Total= 36)	Porcentaje
Bolivia	35	97,2%
Paraguay	1	2,8%

Durante el período de estudio, 2 de las 36 mujeres dieron a luz dos veces después de haber recibido tratamiento; por lo que se realizó el seguimiento en 38 embarazos y un total de 38 recién nacidos fueron estudiados.

El rango de edad de las mujeres en los 38 embarazos fue de 15 a 41 años, siendo la media de edad igual a $32,1 \pm 6,2$ años (media \pm desviación estándar). La distribución de las edades se muestra en la tabla III.12.

Tabla III.12. Edad en el momento del embarazo de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas tratadas antes del embarazo.

Edad	Nº de pacientes (Nº total =38)	Porcentaje
15-25 años	7	18,4%
>25-35 años	19	50%
>35-45 años	12	31,6%

La media de años en España de las mujeres tratadas antes del embarazo fue $8,1 \pm 2,5$ años (media \pm desviación estándar). Todas ellas tenían una estancia larga en nuestro país (≥ 3 años) en el momento del embarazo.

Dos de las mujeres presentaron reacciones adversas a beznidazol que forzaron la suspensión del tratamiento y fueron tratadas de nuevo con nifurtimox, completando el tratamiento antes de quedar embarazadas.

A las madres se les realizó un seguimiento serológico y mediante PCR a los 60-90, 150 y 240 días después del tratamiento. Después del primer año se realizó un control anual. Además, se les tomó una muestra para estudio serológico y molecular durante el embarazo, si éste no coincidía con alguno de los controles establecidos.

Los 38 niños siguieron el protocolo de diagnóstico y seguimiento descrito previamente (figura III.2).

6.7. Grupo 4

De la cohorte general de estudio constituida por 144 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas se seleccionó una cohorte de 50 mujeres de las cuales se disponía de muestra de leche materna, así como, sus descendientes; para el estudio de la lactancia materna como posible vía de transmisión de *T. cruzi*.

En estas 50 madres, además de la muestra de sangre periférica para el estudio serológico y parasitológico, también se tomó muestra de leche materna tras dar a luz para estudio parasitológico mediante PCR de *T. cruzi* (material y métodos, apartado 4). Además, a las mujeres incluidas en este estudio se les preguntó por la fecha de inicio de la lactancia y si habían presentado o no fisuras en los pezones durante la lactancia.

En cuanto al país de procedencia, 49 (98%) procedían de Bolivia y 1 mujer procedía de Ecuador (tabla III.13). Las mujeres bolivianas procedían de los departamentos de Cochabamba (26; 53,1%), Santa Cruz (17; 34,7%), Chuquisaca (3; 6,1%), Tarija (2; 4,1%) y la Paz (1; 2%); y la mujer ecuatoriana procedía de la provincia de Guayas.

Tabla III.13. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en leche materna.

País	Nº de pacientes (Nº Total= 50)	Porcentaje
Bolivia	49	98%
Ecuador	1	2%

El rango de edad de las mujeres en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en leche materna fue de 25 a 45 años, y la media de edad de 33.3 ± 0.7 años (media \pm desviación estándar). La distribución de las edades se muestra en la tabla III.14.

Tabla III.14. Edad de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en leche materna.

Edad	Nº de pacientes (Nº total =50)	Porcentaje
15-25 años	2	4%
>25-35 años	33	66%
>35-45 años	15	30%

La media de años en España de las mujeres en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en leche materna fue $9,7 \pm 0,3$ años (media \pm desviación estándar). Todas ellas tenían una estancia larga en nuestro país (≥ 3 años) en el momento del estudio.

De las 50 mujeres, de las cuales se dispuso de muestra de leche materna para el estudio de *T. cruzi*, 14 de ellas habían recibido tratamiento antes del embarazo y 36 no habían sido tratadas antes del embarazo

En los 50 niños incluidos en este grupo se aplicó el protocolo de diagnóstico y seguimiento descrito previamente (protocolo diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas congénita, figura III.2). Además, para poder establecer el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en recién nacidos o lactante de 1 año o menos a través de la lactancia materna, se consideraron los siguientes factores:

- El resultado de PCR en sangre de cordón (tiempo 0).
- PCR en sangre materna.
- Presencia de fisuras en los pezones.
- Fecha de inició la lactancia materna.
- El resultado de PCR en leche materna.

6.8. Grupo 5

De la cohorte general de estudio constituida por 144 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas se seleccionó una cohorte de 33 mujeres de las cuales se disponía de muestra de placenta y cordón umbilical para el estudio de la presencia de *T. cruzi* mediante PCR en estos tejidos. Con la finalidad de valorar la utilidad de estas muestras para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, así como, para establecer la relación entre la presencia de parásito detectado en sangre y en estos tejidos en la mujer embarazada.

Según el protocolo de paritorio en gestante con enfermedad de Chagas (figura III.1), en el momento del parto se tomó una muestra de placenta y cordón umbilical y se remitió al laboratorio HCUVA para la detección de *T. cruzi* mediante PCR.

Las 33 mujeres en las que siguió el protocolo de paritorio procedían de Bolivia (28; 87,5%), Paraguay (3; 9,4%) y Ecuador (1; 3,1%) (de una de ellas no se dispuso de datos de país de procedencia) (tabla III.15). Las mujeres bolivianas procedían de los departamentos de Cochabamba (12; 42,9%), Santa Cruz (12; 42,9%), Chuquisaca (2; 7,1%), Tarija (2; 7,1%).

Tabla III.15. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en placenta y cordón umbilical.

País	Nº de pacientes (Nº Total= 32)	Porcentaje
Bolivia	28	87,5%
Paraguay	3	9,4%
Ecuador	1	3,1%

El rango de edad de las mujeres en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en placenta y cordón umbilical fue de 20 a 40 años, y la media de edad fue de 32.8 ± 0.9 años (media \pm desviación estándar). La distribución de las edades se muestra en la tabla III.16.

Tabla III.16. Edad de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en placenta y cordón umbilical.

Edad	Nº de pacientes (Nº total =33)	Porcentaje
15-25 años	3	9,1%
>25-35 años	19	57,6%
>35-45 años	11	33,3%

La media de años en España de las mujeres en las que se realizó el estudio de *T. cruzi* en placenta y cordón umbilical, fue de $9,4 \pm 0,6$ (media \pm desviación estándar). Todas ellas tenían una estancia larga en nuestro país (≥ 3 años) en el momento del estudio.

De las 33 mujeres, de las cuales se dispuso de muestra de placenta y cordón umbilical para el estudio de *T. cruzi*, 11 habían recibido tratamiento antes del embarazo y 22 no habían sido tratadas antes del embarazo.

En los 33 niños recién nacidos se aplicó el protocolo de diagnóstico y seguimiento establecido previamente (protocolo diagnóstico y seguimiento de la enfermedad de Chagas congénita, figura III.2). De los 33 recién nacidos se dispuso de la muestra de sangre de cordón umbilical para el diagnóstico.

6.9. Grupo 6

Con la finalidad de estudiar si las mujeres con enfermedad de Chagas tienen un mayor riesgo de padecer abortos espontáneos, se seleccionó una cohorte de 502 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas. Este grupo incluía las 144 mujeres de la cohorte general y 358 mujeres no embarazadas que acudieron a la consulta de Medicina Tropical durante el período de estudio. Como grupo control se incluyó un grupo de 252 mujeres latinoamericanas sin enfermedad de Chagas.

Para obtener esta información, se aprovecharon las jornadas de Captación celebradas anualmente en el HCUVA, en las que se facilita la realización de las pruebas diagnósticas para la enfermedad de Chagas a la población latinoamericana. A las mujeres se les realizó una encuesta en la que se recogieron los siguientes datos:

- País de procedencia
- Años de residencia en España
- Gestaciones
- Abortos provocados
- Abortos espontáneos
- Partos vivos

En cuanto a los datos epidemiológicos, las 502 mujeres con enfermedad de Chagas procedían principalmente de Bolivia (495; 98,6%), 3 mujeres (0,6%) de Paraguay, 2 (0,4%) de Argentina y 2 (0,4%) de Ecuador. El rango de edad de las mujeres fue de 15-

59 años y la media de edad fue de $37,9 \pm 0,4$ años (media \pm desviación estándar). La media de años de residencia en España fue de $6 \pm 0,15$ años (media \pm desviación estándar).

Las 252 mujeres latinoamericanas sin enfermedad de Chagas incluidas como grupo control procedían de Ecuador (145; 57,3%), Bolivia (93; 37%) y Colombia (14; 5,7%). El rango de edad de las mujeres fue de 16-58 años y la media de edad fue de $38,6 \pm 0,6$ años (media \pm desviación estándar). La media de años de residencia en España fue de $12,2 \pm 0,2$ años (media \pm desviación estándar).

Tabla III.17. Resumen de los grupos de pacientes en función del estudio realizado.

Estudio	Grupo de pacientes
Factores de riesgo implicados en la transmisión materno-fetal de <i>T. cruzi</i> : estado parasitológico de las madres (PCR para <i>T. cruzi</i> positiva) y datos epidemiológicos (país, departamento, edad y años de residencia en España).	Cohorte general: 144 mujeres con 159 embarazos y 160 recién nacidos.
Incremento de la parasitemia detectado por PCR durante el embarazo.	Grupo 1: 113 mujeres latinoamericanas no tratadas antes del embarazo y un grupo control de 150 mujeres latinoamericanas no embarazadas y no tratadas.
Carga parasitaria como factor de riesgo implicado en la transmisión vertical de <i>T. cruzi</i> al recién nacido.	Grupo 2: 19 mujeres latinoamericanas no tratadas con resultado de PCR positivo para <i>T. cruzi</i> , 9 que transmitieron la infección al recién nacido y 10 que no transmitieron la infección.
Tratamiento de la mujer en edad fértil como medida de prevención de la transmisión de <i>T. cruzi</i> .	Grupo 1: 113 mujeres latinoamericanas no tratadas antes del embarazo, en un total de 121 embarazos y sus 122 recién nacidos. Grupo 3: 38 embarazos de 36 mujeres latinoamericanas tratadas antes del embarazo y sus 38 recién nacidos.
Leche materna como posible vía de transmisión de <i>T. cruzi</i> .	Grupo 4: 50 madres lactantes y sus recién nacidos
Evaluación de técnicas serológicas, parasitológicas y moleculares para el diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas congénita	Cohorte general: 160 recién nacidos.
Evaluación de la muestra más adecuada para la diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita mediante PCR	Cohorte general: muestra de sangre periférica de 145 niños y muestra de sangre de cordón de 46 niños Grupo 5: Muestras de tejido de placenta y de cordón umbilical de 33 embarazos
Relación entre la enfermedad de Chagas y los abortos espontáneos	Grupo 6: 502 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas y un grupo control de 252 mujeres latinoamericanas sin enfermedad de Chagas.

7. Análisis estadístico

Los resultados se analizaron con el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 23.0.

La distribución normal de las variables se realizó mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. En caso que no tener una distribución normal se aplicaron test no paramétricos.

Las variables del estudio se analizaron mediante el cálculo de estadísticos descriptivos básicos. Respecto a las variables cualitativas, se describieron sus frecuencias absolutas y porcentajes de cada una de las categorías. Las variables cuantitativas continuas, se describieron con el valor de la media \pm desviación estándar.

Para comparar variables cualitativas como la relación entre la parasitemia detectada mediante PCR de *T. cruzi* y el aumento del riesgo de transmisión de la enfermedad, el tratamiento de la mujer en edad fértil y la prevención de la transmisión, el incremento de parasitemia detectado por PCR y el embarazo, o la relación entre la enfermedad de Chagas y los abortos espontáneos; se aplicó la prueba Chi-Cuadrado.

Para comparar variables cualitativas frente variables cuantitativas, en el caso de no seguir esta última una distribución normal, como al comparar los años de residencia en España de las mujeres y el riesgo de transmisión de la infección, o la carga parasitaria como factor de riesgo de la transmisión; se aplicó el test U de Mann-Whitney.

En el caso de comparar variables cualitativas frente variables cuantitativas, en el caso de seguir esta última una distribución normal, como al comparar la edad de las mujeres embarazadas y el riesgo de transmisión de la infección, se realizó la prueba t de Student.

En todos los contrastes de hipótesis realizados con técnicas estadísticas, se aceptó la existencia de significación estadística para una confianza superior al 95%, admitiendo un valor aleatorio inferior al 5% ($p < 0.05$).

8. 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 sólo han tenido acceso los facultativos e investigadores del IMIB-HCUVA que han participado en éste estudio, asegurando la confidencialidad de los mismos, estableciendo el protocolo pertinente para ello.

IV. RESULTADOS

1. Factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.

La tasa de transmisión vertical detectada en nuestro estudio fue del 10% (16 casos congénitos de 160 nacimientos de madres con serología positiva para *T. cruzi*).

Para estudiar los factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de *T. cruzi* se analizaron los datos epidemiológicos y el estado parasitológico de 131 madres que no transmitieron la infección en 144 embarazos, frente a 13 madres que transmitieron la infección al recién nacido en 15 embarazos (uno de los embarazos fue gemelar) (material y métodos, apartado 6.3).

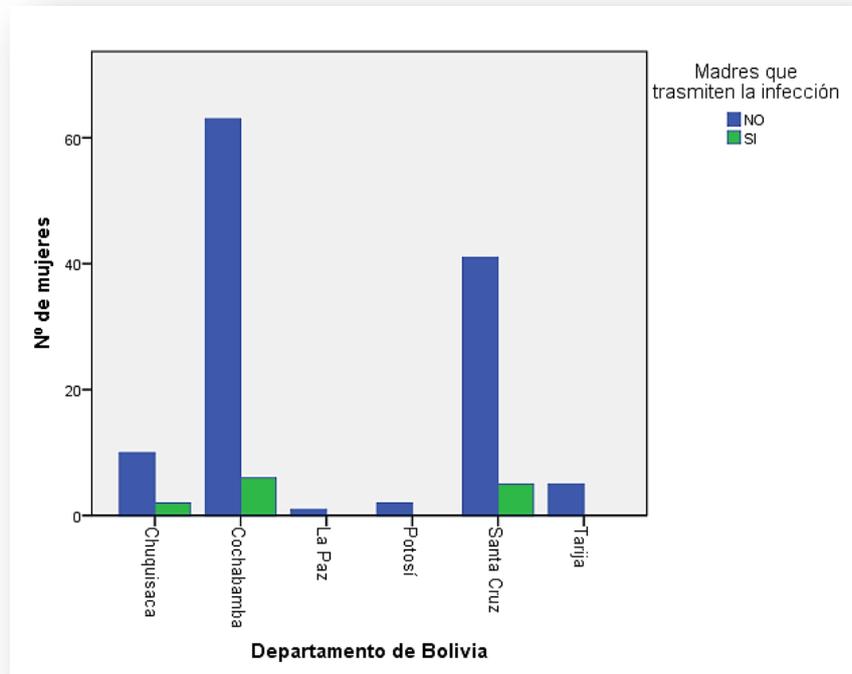
1.1. Factores epidemiológicos:

1.1.1. País y región de origen

Las 13 mujeres que transmitieron la infección a sus recién nacidos procedían de Bolivia; concretamente de los departamentos de: Cochabamba (6; 46,2%), Santa Cruz (5; 38,5%) y Chuquisaca (2; 15,3%). No se encontraron diferencias significativas entre el departamento de procedencia y la transmisión de la infección ($p = 0,891$).

En la figura IV.1 se compara el departamento de procedencia de las madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que transmitieron la infección a sus recién nacidos, frente a las madres que no transmitieron la infección a sus recién nacidos.

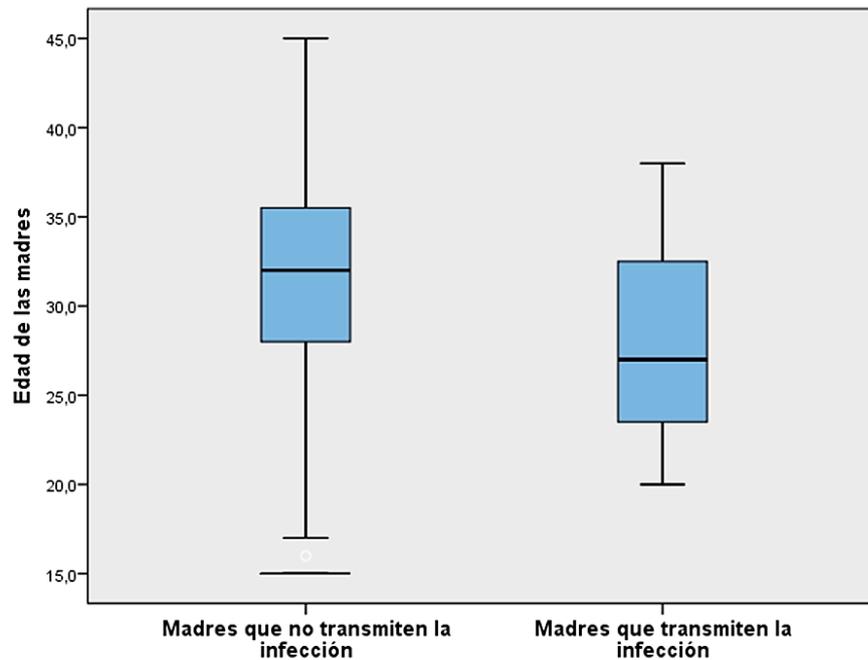
Figura IV.1. Departamento de procedencia de las mujeres bolivianas con enfermedad de Chagas que transmiten y no transmiten la infección a sus recién nacidos.



1.1.2. Edad

El rango de edad de las madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que no transmitieron la infección a sus recién nacidos fue de 30 a 45 años, siendo la media de edad $31,4 \pm 5,8$ años (media \pm desviación estándar). Mientras que, el rango de edad de las madres que transmitieron la infección a sus recién nacidos fue de 20 a 38 años, siendo la media de edad $28,3 \pm 5,8$ años (media \pm desviación estándar) (figura IV.2). Las mujeres que transmitieron la infección a sus recién nacidos eran más jóvenes en el momento del embarazo, que las que no transmitieron la infección. No obstante, aunque se observó una tendencia de transmisión vertical entre las mujeres de edad más joven los datos no fueron estadísticamente significativos. Probablemente, debido a que el número de mujeres que transmiten la infección a sus recién nacidos es bajo comparado con las mujeres que no transmiten la infección ($p = 0,06$).

Figura IV.2. Comparación de la edad de las madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que transmitieron la infección a sus recién nacidos, respecto a las que no la transmitieron.



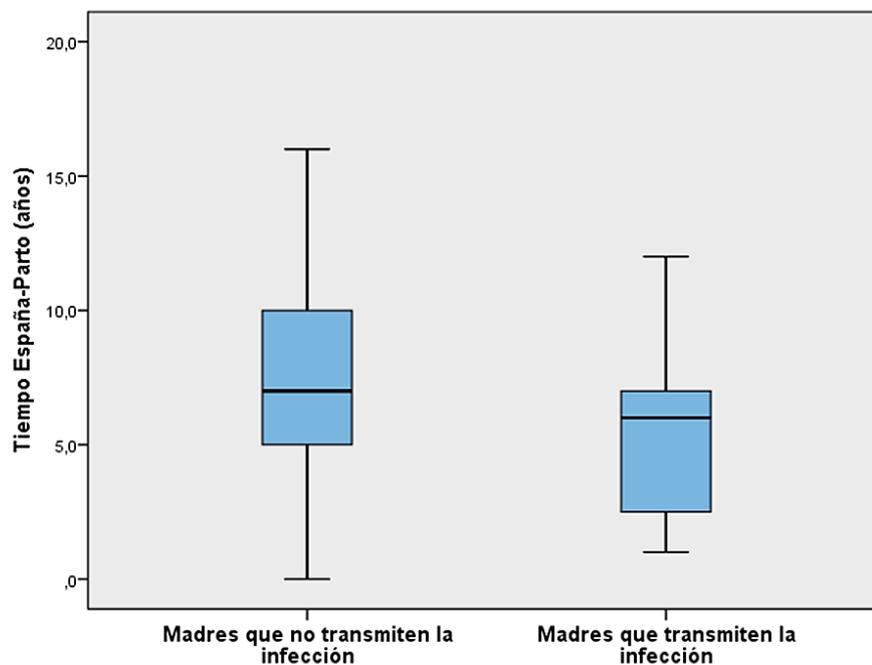
1.1.3. Años en España

Se analizaron los años de residencia en España de las madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas en el momento del parto. Una estancia corta en nuestro país podría implicar una infección en la madre más reciente. Considerándose una estancia corta en España < 2 años y una estancia larga ≥ 3 años.

El rango de años de residencia en España de las madres que no transmitieron la infección a sus recién nacidos fue de 0 a 16 años, siendo la media de años de residencia $7,1 \pm 3,4$ años (media \pm desviación estándar). Mientras que, el rango de años de residencia en España de las mujeres que transmitieron la infección a sus recién nacidos fue de 1 a 12 años, siendo la media de edad $5,1 \pm 3$ años (media \pm desviación estándar) (figura IV.3). Se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los años de residencia en España y el riesgo de transmisión de la infección al recién nacido. La

media de años de residencia en España fue menor en las mujeres que transmitieron la infección a sus hijos ($p = 0,005$). Sin embargo, la mayoría de las mujeres que transmitieron la infección a sus descendientes, en el momento del embarazo (73,3%), llevaban más de 3 años de residencia en nuestro país, es decir, tenían estancia larga en nuestro país.

Figura IV.3. Años de residencia en España de madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas que transmiten y no transmiten la infección a sus descendientes.



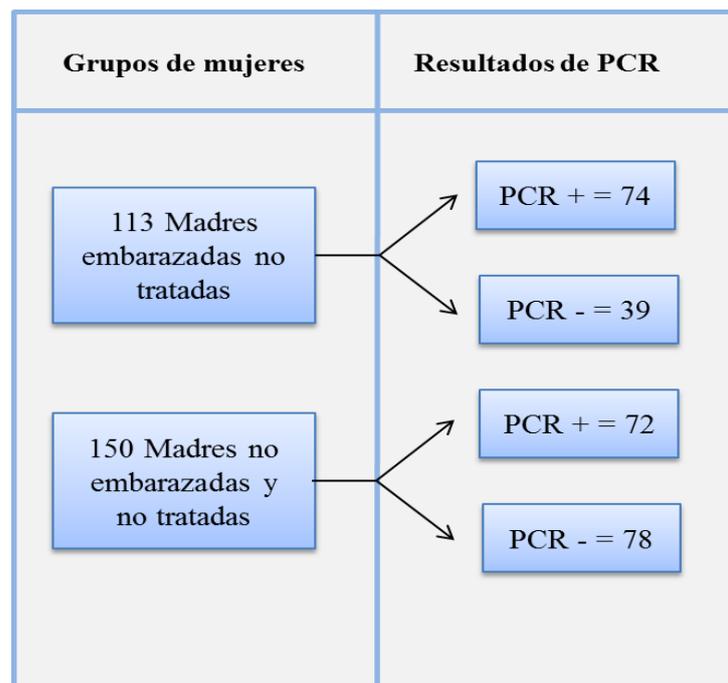
1.2. Parasitemia en las madres detectada mediante PCR de *T. cruzi*.

1.2.1. Estado parasitológico de las madres durante el embarazo

Se estudió si durante el embarazo se produce un incremento de la parasitemia detectado mediante PCR de *T. cruzi*; para ello se comparó el estado parasitológico de las 113 mujeres embarazadas latinoamericanas que no habían sido tratadas antes del embarazo, con un grupo control de 150 mujeres latinoamericanas no embarazadas y que no habían recibido tratamiento (material y métodos, apartado 6.4).

De las 113 mujeres embarazadas, el 65,5% (74/113) presentó un resultado de PCR positivo; mientras que en las mujeres no embarazadas el resultado de la PCR fue positivo en el 48% (72/150) de ellas. Se encontró una relación estadísticamente significativa entre el embarazo y el incremento de la parasitemia detectado mediante PCR de *T. cruzi* ($p = 0,005$) (figura IV.4).

Figura IV.4. Comparación del estado parasitológico analizado mediante PCR de *T. cruzi* en las mujeres embarazadas con enfermedad de Chagas, respecto a las no embarazadas.



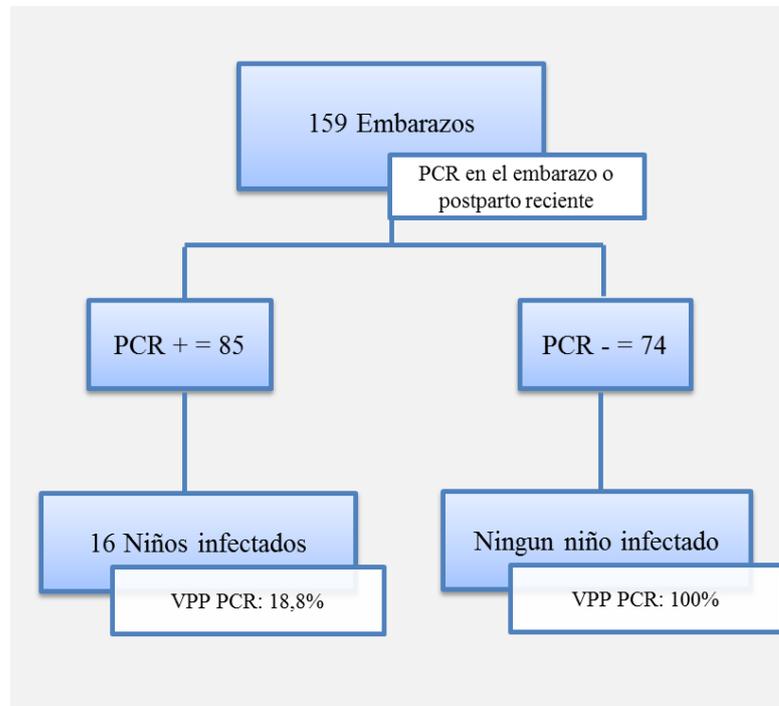
1.2.2. Valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical

Para estudiar el valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical de *T. cruzi* se analizó el estado parasitológico de las 144 madres en los 159 embarazos en los que se dieron a luz 160 niños (un embarazo fue gemelar) (material y métodos, apartado 6.3).

La PCR de *T. cruzi* se realizó en el tercer trimestre del embarazo o inmediatamente después de dar a luz en los 159 embarazos. En 85 de los embarazos se obtuvo un resultado de PCR positivo y en 74 de ellos se obtuvo un resultado de PCR negativo.

En 15 de los 85 embarazos en los que la madre obtuvo un resultado de PCR positivo, se produjo la transmisión vertical de la infección al recién nacido, resultado infectados 16 niños (dos de los niños infectados eran gemelos); el valor predictivo positivo de la PCR fue de 18,8% (IC95%:11,8-28,1) (16 niños infectados de 85 embarazos de madres con resultado de PCR positivo). Sin embargo, en los 74 embarazos en los que la madre obtuvo un resultado de PCR negativo, ninguno de los recién nacidos resultó infectado; el valor predictivo negativo de la PCR fue del 100% (IC95%:95,1-100%) (ningún niño infectado de 74 embarazos de madres con resultado negativo de PCR). Los resultados mostraron una relación estadísticamente significativa entre un resultado de PCR positivo durante el embarazo y un mayor riesgo de transmisión de la infección por *T. cruzi* al recién nacido ($p = 0,001$). Estos resultados se muestran en la figura IV.5.

Figura IV.5. Valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas



VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo

1.2.3. Cuantificación de la carga parasitaria

Para estudiar la carga parasitaria como factor de riesgo implicado en la transmisión vertical, se realizó la PCR cuantitativa (material y métodos, apartado 4.4) en una cohorte de 19 mujeres con un resultado de PCR para *T. cruzi* positiva durante el embarazo (material y métodos, apartado 6.5). De estas, 9 madres transmitieron la infección al recién nacido. Una vez determinada la carga parasitaria, se analizó si las mujeres que transmitieron la infección a sus recién nacidos tenían mayores cargas parasitaria respecto a aquellas que no transmitieron la infección.

En la tabla IV.1 se detallan los resultados obtenidos con la técnica de PCR cuantitativa de *T. cruzi* realizada a las 19 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas.

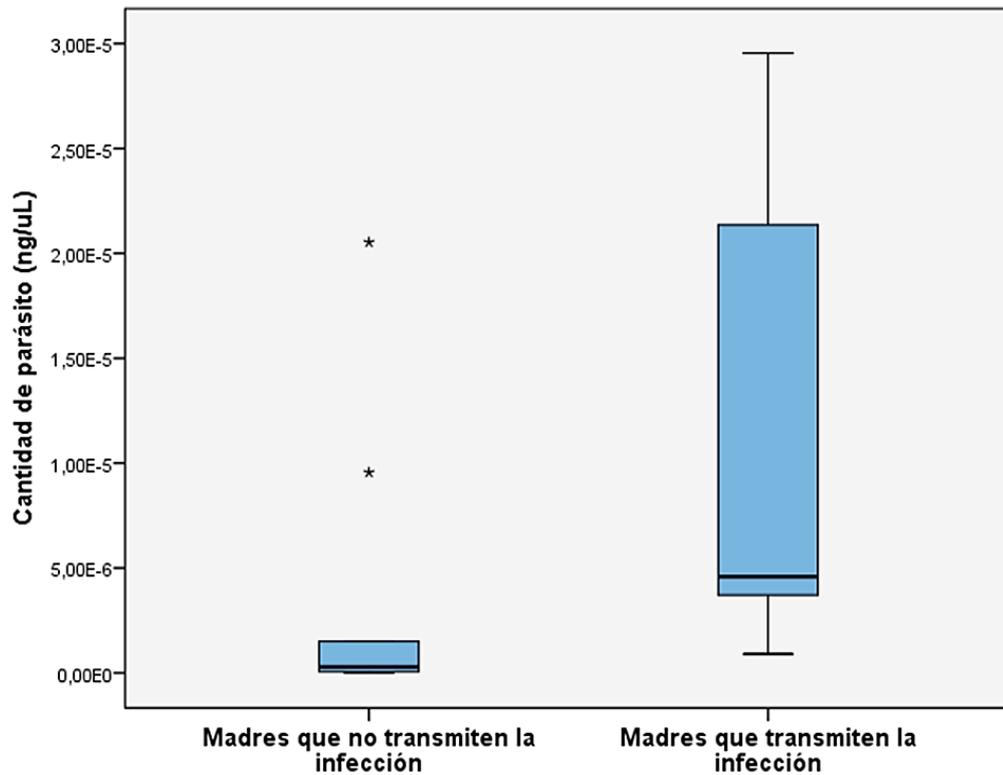
La carga parasitaria media en las mujeres que no transmitieron la infección fue de $3,29 \times 10^6$ ng/uL (IC95%: $1,53 \times 10^6$ - $8,1 \times 10^6$), mientras que la carga parasitaria media en las mujeres que transmitieron la infección fue de $1,04 \times 10^5$ ng/uL (IC95%: $1,87 \times 10^5$ - $2,13 \times 10^5$), existiendo una relación estadísticamente significativa entre la carga parasitaria y la transmisión vertical; las mujeres que transmiten la infección a sus hijos presentaron mayor carga parasitaria que las que no transmiten la infección ($p = 0,008$). Los resultados se muestran en la figura IV.6 mediante un gráfico de cajas, donde viene representada la distribución de los valores obtenidos, la línea negra horizontal representa la mediana de las mujeres que transmiten y no transmiten la infección, el rectángulo representa el 50 % de las observaciones centrales y los asteriscos representan los valores atípicos.

IV. Resultados

Nº de muestra	Madres	Ct	Carga parasitaria (ng/uL)
1	Madre del congénito nº 1	25,37413788	2,13541E-05
2	Madre del congénito nº 2	27,22302628	4,58993E-06
3	Madre del congénito nº 3	24,98542023	2,95479E-05
4	Madre del congénito nº 4	27,43217278	3,82968E-06
5	Madre de congénito nº 5	27,47171021	3,70452E-06
6	Madre del congénito nº 6	28,25458145	1,92653E-06
7	Madre de congénito nº 7	25,33694267	2,2053E-05
8	Madre de los congénitos nº 8 y 9	26,94373703	5,75706E-06
9	Madre del congénito nº 10	29,1554985	9,07991E-07
10	Madre que no transmite	30,42436218	3,15784E-07
11	Madre que no transmite	32,5946579	5,14009E-08
12	Madre que no transmite	31,24137115	1,60329E-07
13	Madre que no transmite	30,76203156	2,46638E-07
14	Madre que no transmite	28,55110931	1,504E-06
15	Madre que no transmite	34,1544342	1,39753E-08
16	Madre que no transmite	26,33897781	9,55877E-06
17	Madre que no transmite	25,42139244	2,05308E-05
18	Madre que no transmite	29,98917389	4,53607E-07
19	Madre que no transmite	33,68457031	2,20823E-08

Tabla IV.1. Resultados obtenidos al realizar la PCR cuantitativa de *T. cruzi* a 19 madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas, 9 que transmitieron la infección a sus recién nacidos y 10 que no transmitieron la infección. En la tabla aparecen 4 columnas: la primera hace referencia al número de muestra (del 1 al 19), la segunda columna indica si la madre transmitió o no la infección a su hijo, en la tercera columna viene recogido el Ct (ciclo umbral, punto en el cual la reacción de amplificación da comienzo) de cada una de las muestras, y en la quinta columna la carga parasitaria a la que se corresponde ese Ct, expresada en ng/uL.

Figura IV.6. Comparación de la carga parasitaria, expresada en ng/uL, entre las madres que transmiten la infección a sus recién nacidos y las que no la transmiten la infección.



Los asteriscos (*) hacen referencia a dos valores que se desvían respecto a la media, corresponden al número de muestra 16 y 17, dos madres que no transmiten la infección pero que tienen una carga parasitaria más alta, similar a las madres que sí que la transmiten.

Los resultados obtenidos muestran que las mujeres que transmiten la infección a sus hijos tienen mayores cargas parasitarias que las que no transmiten la infección (figura IV.7). No obstante, no se pudo establecer una carga parasitaria límite a partir de la cual se produce la transmisión vertical de *T. cruzi*; dado que hay madres que no transmiten la infección con cargas parasitarias similares a las madres que sí que la transmiten (madres número 16 y 17, tabla IV.1), siendo el rango de la carga parasitaria de las madres que

transmitieron la infección de 3×10^5 ng/uL a $9,1 \times 10^7$ ng/uL, y el de madres que no transmitieron la infección de $2,05 \times 10^5$ ng/uL a $1,4 \times 10^8$ ng/uL.

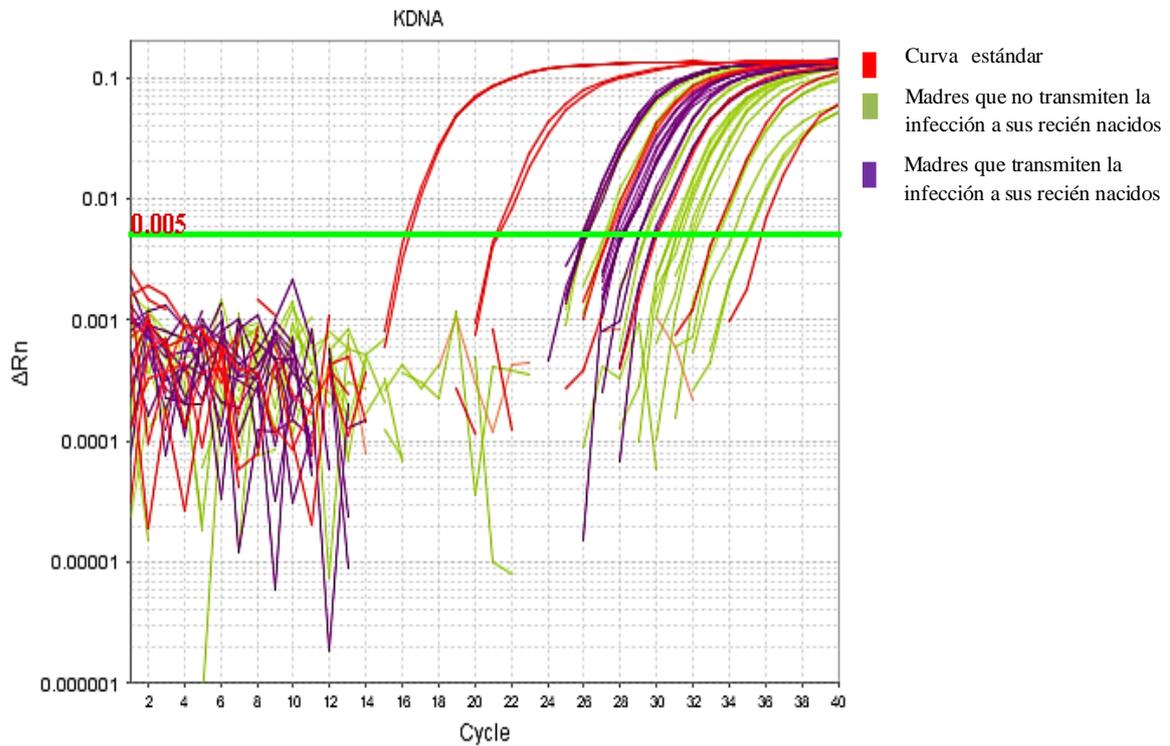


Figura IV.7. Gráfico que representa el punto de la gráfica de amplificación en el que la señal del notificador fluorescente normalizado con la línea basal corregida (valor delta Rn [ΔRn]) cruza el umbral. El ciclo fraccional en el que el valor ΔRn cruza el umbral se define como Ct (Cycle). La línea roja representa el Ct al que amplifican las diluciones 1/10 realizadas a partir de 0.01 ng/ μL de *T. cruzi*, genotipo I (concretamente se prepararon diluciones hasta obtener 10^{-7} ng/ μL) (curva estándar), la línea verde representa el Ct al que amplifican las madres que no transmitieron la infección a sus recién nacidos, y la línea lila representa el Ct al que amplifican las madres que si transmitieron la infección a sus recién nacidos.

2. Tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida de prevención primaria de la transmisión vertical de *T. cruzi*.

De las 144 mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas incluidas en nuestro estudio, 36 habían recibido tratamiento antes del embarazo y 113 no habían sido tratadas. Se realizó un estudio del estado parasitológico mediante PCR y serología tanto de las madres como de los recién nacidos, para evaluar si el tratamiento de la mujer en edad fértil es una medida eficaz para prevenir la transmisión vertical de *T. cruzi* (material y métodos, apartado 6.4 y 6.6).

Durante el período de estudio, dos de las 36 mujeres dieron a luz dos veces después de haber recibido tratamiento; por lo que se realizó el seguimiento en 38 embarazos y un total de 38 recién nacidos de madres que habían sido tratadas antes del embarazo fueron estudiados. Mientras que de las 113 mujeres que no habían sido tratadas antes de embarazo, 4 de ellas dieron a luz dos veces y 2 de ellas dieron a luz tres veces durante el período de estudio; por lo que se realizó el seguimiento en 121 embarazos y un total de 122 niños de madres que no habían sido tratadas antes del embarazo (uno de los embarazos fue gemelar) fueron estudiados.

Las 36 mujeres fueron tratadas con beznidazol, 5-7 mg/kg peso corporal/día en tres tomas diarias durante 60 días. Se les realizó un control serológico y parasitológico, mediante PCR, antes de iniciar el tratamiento y posteriormente se realizó un seguimiento mediante PCR y serología a los 60-90, 150, 240 y anualmente después de tratamiento (material y métodos, apartado 5).

De las 36 mujeres tratadas con beznidazol, el 41,7% (15/36) presentaron reacciones adversas a este fármaco. Las reacciones adversas más frecuentes fueron: la hipersensibilidad cutánea (12/15; 80%), alteraciones neurológicas (4/15; 26,7%) e intolerancia digestiva (vómitos y dolor abdominal) (3/15; 20%); cinco mujeres presentaron dos o más de efectos secundarios al tratamiento. En 2 pacientes, las reacciones adversas forzaron la suspensión del tratamiento, en ambos casos por una dermatitis por hipersensibilidad. Estas dos mujeres fueron tratadas de nuevo con nifurtimox, la dosificación utilizada fue 10 mg/kg de peso corporal/día en dos tomas diarias durante 90 días antes de quedarse embarazadas.

La media de edad de las mujeres al inicio del tratamiento fue de $29,2 \pm 5,8$ años (media \pm desviación estándar), siendo el rango de edad de 15 a 38 años. Un 27,8% fueron tratadas entre los 15 y los 25 años, el 55,6% entre los 26 y los 35 años y un 16,6% con más de 35 años.

El tiempo transcurrido en años desde que las mujeres recibieron el tratamiento hasta el momento en el que dieron a luz, fue de 1 a 9 años, siendo la media 3.5 ± 2 años (media \pm desviación estándar).

El resultado de la PCR antes de iniciar el tratamiento (T_0) fue positivo en el 52,8% (19/36) de las madres y negativo en el 33,3% (12/36) de ellas, de 5 de las madres no se dispuso del resultado de la PCR antes del inicio del tratamiento. Dos de las madres con resultado positivo de PCR antes de iniciar el tratamiento, tuvieron dos embarazos durante el período de estudio (madres 9 y 17, tabla IV.2).

De las 19 madres con resultados positivo de PCR antes de iniciar el tratamiento, la PCR negativizó en 11 de ellas en el control de los 90 días post-tratamiento; en las 8 restantes no se dispuso del control de los 90 días post-tratamiento, aunque la PCR fue negativa en el siguiente control realizado tras finalizar el tratamiento: una a los 150 días post-tratamiento, dos a los 240 días post-tratamiento, dos al año post-tratamiento, una a los tres años post-tratamiento y una a los cuatro años post-tratamiento (tabla IV.2).

De las 12 madres con resultado negativo de PCR antes de iniciar el tratamiento, la PCR se mantuvo negativa en 5 de ellas en el control realizado a los 90 días post-tratamiento; mientras que en las otras 7 no se dispuso de control de los 90 días post-tratamiento y la PCR fue negativa en el siguiente control realizado tras finalizar el tratamiento: tres a los 240 días post-tratamiento, dos a los dos años post-tratamiento, una a los tres años post-tratamiento y una a los cuatro años post-tratamiento (los resultados se muestran en la tabla IV.2).

Durante los controles post-tratamiento, la PCR se mantuvo negativa hasta el momento del parto en 33 de las mujeres, dos de ellas dieron a luz dos veces (35 embarazos). Sin embargo, en 3 de las mujeres la PCR volvió a ser positiva durante del embarazo, a pesar de haber tomado adecuadamente el tratamiento. Observándose un 7,9% de recidivas detectadas mediante PCR (3 mujeres de 38 embarazos). En una de ellas la PCR volvió a ser positiva en el control del primer año post-tratamiento (mujer

Factores de riesgo y prevención primaria de la enfermedad de Chagas congénita

número 24, tabla IV.2), otra en el control de los tres años post-tratamiento (mujer número 31, tabla IV.2) y finalmente, una en el control de cuarto año post-tratamiento (mujer número 19, tabla IV.2).

Tabla.IV.2. Seguimiento post-tratamiento mediante PCR de las madres tratadas hasta el momento del parto.

Madres	Edad inicio (años)	Tiempo tt ^o -parto (años)	Resultados de PCR												
			T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀	T ₁₁	T ₁₂
1	37	2	+	-	-	NR	-	-							
2	32	9	+	-	NR	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-
3	33	3	+	NR	NR	NR	NR	-	-						
4	25	2	+	NR	-	NR	NR	-							
5	30	2	-	-	NR	NR	NR	-							
6	34	6	+	NR	NR	NR	-	-	NR	-	-	-			
7	22	2	+	-	-	-	-	-							
8	23	3	+	-	-	-	-	-							
9*	17	4 y 8	+	-	-	-		NR	-	-	NR	-	NR	-	
10	30	7	-	-	-	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-		
11	37	2	+	NR	NR	-	NR	-							
12	36	2	NR	NR	NR	NR	NR	-							
13	38	2	-	NR	NR	NR	NR	-							
14	25	7	+	-	-	NR	-	-	-	NR	NR	NR	-		
15	27	4	+	-	NR	NR	-	-	NR	-					
16	36	2	-	NR	NR	NR	NR	-							
17*	28	2 y 5	+	NR	NR	-	NR	-	NR	NR	-				
18	29	5	-	-	-	-	-	NR	-	-	-				
19**	25	4	+	-	NR	NR	-	-	NR	+					
20	31	4	-	-	NR	-	-	NR	NR	-					
21	27	5	+	NR	-	-									
22	31	4	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-				
23	32	3	+	-	NR	NR	-	NR	-						
24**	37	1	NR	NR	NR	NR	+								
25	35	5	-	NR	-										
26	34	3	+	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-					
27	31	2	NR	-	NR	NR	NR	NR	-						
28	26	3	+	-	NR	NR	NR	NR	-						
29	24	4	+	NR	NR	NR	-	-	NR	-					
30	38	4	-	NR	NR	NR	NR	NR	NR	-	-				
31**	32	3	NR	-	NR	NR	-	NR	+						
32	26	3	-	NR	NR	-	-	-	-						
33	27	4	+	-	-	NR	-	-	-	-					
34***	25	1	-	NR	NR	-									
35***	20	1	-	NR	NR	-									
36***	15	1	-	-	NR	NR									

El símbolo más (+) indica resultado positivo; el símbolo menos (-) indica resultado negativo.

Abreviaturas: ttº, tratamiento; NR, no realizado; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; T₀, resultado de PCR antes de iniciar el tratamiento; T₁, resultado de PCR a los 90 días post-tratamiento; T₂, resultado de PCR a los 150 días post-tratamiento; T₃, resultado de PCR a los 240 días post-tratamiento; T₄, resultado de PCR al año post-tratamiento; T₅, resultado de PCR a los dos años post-tratamiento; T₆, resultado de PCR a los tres años post-tratamiento; T₇, resultado de PCR a los cuatro años post-tratamiento, T₈, resultado de PCR a los cinco años post-tratamiento; T₉, resultado de PCR a los seis años post-tratamiento; T₁₀, resultado de PCR a los siete años post-tratamiento; T₁₁, resultado de PCR a los ocho años post-tratamiento; T₁₂, resultado de PCR a los nueve años post-tratamiento.

* Madres que dieron a luz dos veces después de haber recibido tratamiento.

**Las madres 24, 31 y 19 sufrieron un fracaso terapéutico, diagnosticado con un resultado de PCR positivo al año, a los tres años y a los cuatro años post-tratamiento respectivamente.

*** Madres que se quedaron embarazadas inmediatamente después de finalizar el tratamiento.

En las madres que no habían sido tratadas, la PCR fue positiva en 82 embarazos de los 121 embarazos en los que realizó el seguimiento. Por tanto el 67,8% de las madres no tratadas presentó un resultado de PCR positivo durante el embarazo (los resultados se muestran en la figura IV.8).

Ninguna de las madres que recibió tratamiento antes del embarazo transmitió la infección a su recién nacido, a pesar de que 3 mujeres presentaron resultados de PCR positivos durante el embarazo. Los resultados muestran un 0% de transmisión vertical de la infección en este grupo de mujeres (ningún niño infectado de 38 embarazos de madres tratadas). Mientras que, de los 121 embarazos de madres que no habían recibido tratamiento, 16 niños resultaron infectados; lo que implica un 13,2% de transmisión vertical de la infección en este grupo de mujeres (16 niños infectados de 121 embarazos de madres no tratadas). Cabe resaltar que los 16 niños infectados nacieron de madres PCR positivas durante el embarazo, como se describió anteriormente (resultados, apartado 1.2.2).

Estos resultados ponen de manifiesto la eficacia del tratamiento de la mujer en edad fértil para prevenir la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi*. Los datos

mostraron que existe una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas congénita ($p = 0.019$) (los resultados se muestran en la figura IV.8).

Cabe destacar que, dos mujeres que no habían recibido tratamiento antes de su primer embarazo, transmitieron la infección a sus recién nacidos. Mientras que, en su segundo embarazo, tras haber recibido tratamiento; ninguna de las dos mujeres transmitió la infección (figura IV.9).

Figura IV.8. Comparación de los resultados de PCR de las madres tratadas y no tratadas antes del embarazo, con la transmisión vertical de *T. cruzi*.

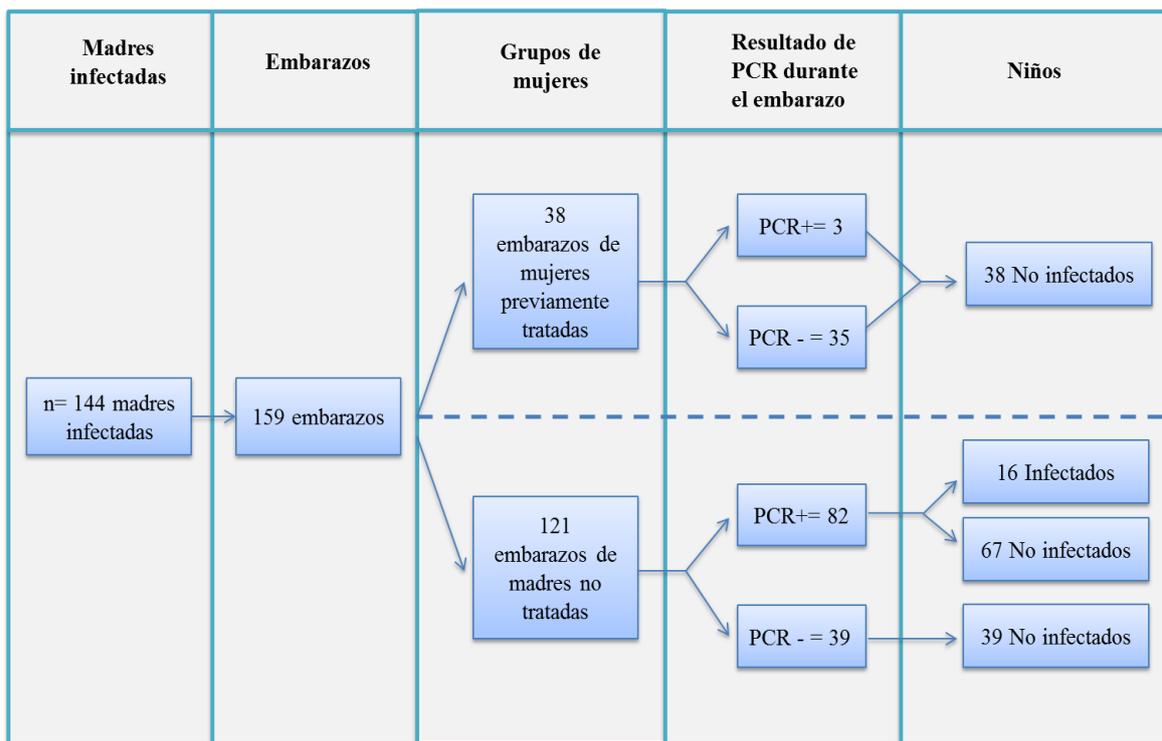


Figura IV.9. Tratamiento y transmisión vertical de la infección de las madres que dieron a luz varias veces durante el período de estudio.

Madres infectadas	Embarazos	Tratamiento	Transmite la infección
M1*	1°	NO	SI
	2°	SI	NO
M2	1°	NO	NO
	2°	NO	SI
M3	1°	NO	NO
	2°	SI	NO
	3°	SI	NO
M4	1°	NO	NO
	2°	NO	NO
	3°	NO	NO
M5	1°	NO	NO
	2°	NO	NO
M6	1°	SI	NO
	2°	SI	NO
M7	1°	NO	NO
	2°	NO	SI
M8	1°	NO	SI
	2°	NO	NO
M9*	1°	NO	SI
	2°	SI	NO
M10	1°	NO	NO
	2°	SI	NO
M11	1°	NO	NO
	2°	SI	NO
M12**	1°	NO	SI
	2°	NO	SI
	3°	NO	SI

*Dos madres que en su primer embarazo no habían sido tratadas y transmitieron la infección a sus recién nacidos; mientras que, en su segundo embarazo tras haber recibido tratamiento no transmitieron la infección.

** Una madre que dio a luz tres veces, no habiendo recibido tratamiento en ninguna ocasión, transmitió la infección en los tres embarazos.

3. Estudio de la lactancia materna como posible vía de transmisión de *T. cruzi* al recién nacido.

Para estudiar el papel de la lactancia materna como posible vía de transmisión de *T. cruzi* se realizó un seguimiento en 50 mujeres de las cuales se disponía de muestra de leche materna y de sus 50 recién nacidos. En los recién nacidos que resultaron infectados se estudió si la transmisión se había producido a través de la leche materna. Para ello se tuvieron en cuenta los siguientes factores: el resultado de PCR en sangre de cordón, el resultado de la PCR en sangre materna, la presencia de fisuras en los pezones, la fecha de inicio de la lactancia materna y el resultado de la PCR en leche materna (material y métodos, apartado 6.7).

De las 50 mujeres incluidas en el estudio, 14 de ellas habían recibido tratamiento antes del embarazo y 36 no habían recibido tratamiento.

En todas las mujeres la muestra de leche materna tras dar a luz y la muestra de sangre periférica se les tomó en el mismo momento; ambas muestras fueron procesadas para estudio parasitológico mediante PCR de *T. cruzi* (material y métodos, apartado 4).

3.1. Análisis parasitológico de las muestras de sangre de las madres

Se llevó a cabo la detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR en la muestra de sangre de 50 mujeres.

De las 36 madres no tratadas antes del embarazo, el 69,44% (25 de 36 mujeres) tuvieron un resultado de PCR positivo en sangre, tres de estas madres transmitieron la infección por *T. cruzi* a sus recién nacidos. En cambio entre las madres tratadas antes del embarazo, el 92,9% (13 de 14 mujeres) tuvo un resultado de PCR negativo en sangre periférica, y ninguna transmitió la infección a su recién nacido (figura IV.10).

3.2. Análisis parasitológico de las muestras de leche

El análisis parasitológico de las muestras de leche materna se llevó a cabo en las 50 mujeres. Las muestras de leche fueron procesadas de tres maneras diferentes (ver material y métodos, apartado 1), realizándose la PCR en un total de 147 muestras de leche materna (de tres de las muestras no se dispuso de la alícuota de leche mezclada con tampón de lisis guanidina-EDTA, debido al reducido volumen de la muestra remitido al laboratorio).

A diferencia de los resultados de PCR en muestras de sangre (positiva en el 69,44% de madres no tratadas), la presencia del parásito en leche materna solo se detectó en una mujer, con parasitemia detectable por PCR (resultado de PCR en sangre periférica positivo) y que no transmitió la infección al recién nacido. La PCR fue positiva en la muestra de leche materna conservada a -20°C y procesada directamente (sin tampón de lisis guanidina-EDTA y sin hervir antes de realizar la extracción de ADN), en esta mujer no se dispuso de la alícuota de leche con guanidina debido al reducido volumen de muestra disponible (figura IV.10). La posible contaminación de la leche materna con la sangre infectada por la presencia de grietas en los pezones fue descartada.

El niño recibió lactancia materna durante 11 meses, se le realizó el seguimiento serológico y parasitológico durante un año, no detectándose la presencia de *T. cruzi*. Por lo tanto, se consideró que no había adquirido la infección.

En los tres casos en los que se produjo transmisión vertical de la infección por *T. cruzi*, la PCR en leche materna fue negativa. Así como, en todos los casos en los que la madre había sido tratada antes del embarazo (figura IV.10).

A pesar de haber detectado la presencia del parásito en una de las muestras de leche materna, los resultados indican que la transmisión de *T. cruzi* a través de la lactancia materna es poco probable.

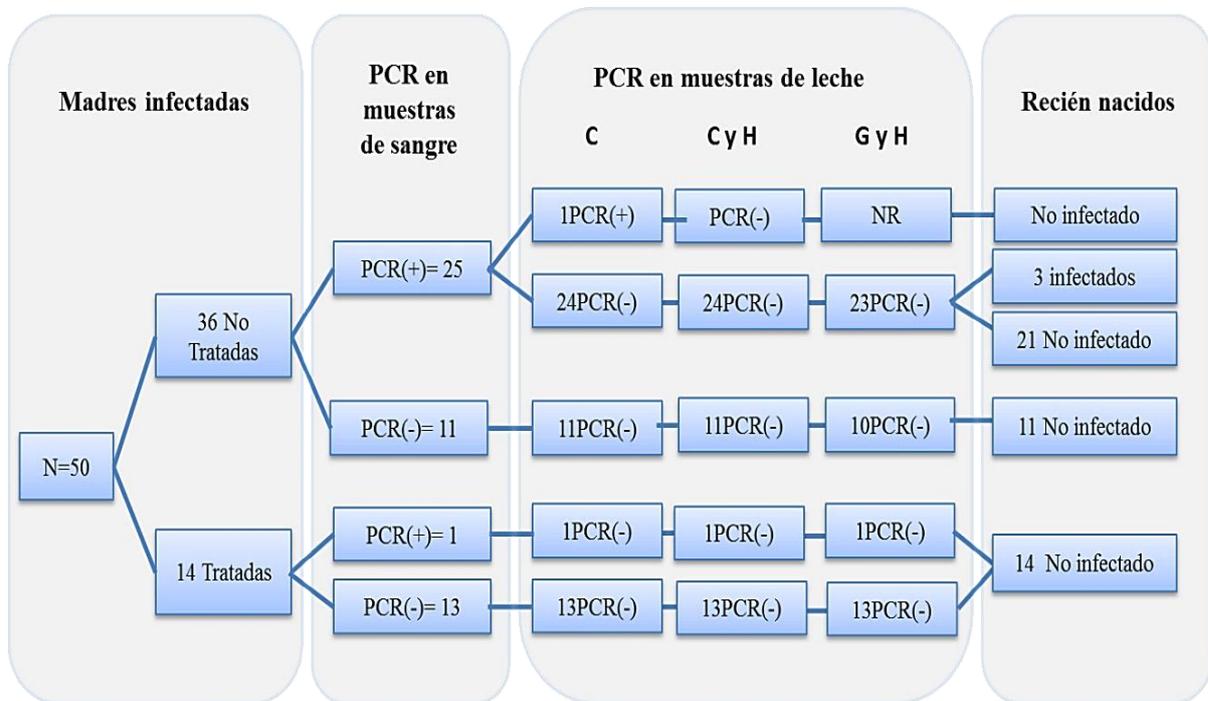
3.3. Diagnóstico de los recién nacidos infectados

Se diagnosticaron 3 casos de enfermedad de Chagas congénita entre los 50 recién nacidos en los que se llevó a cabo el estudio de la leche materna como posible vía de transmisión de *T. cruzi*. Los tres congénitos nacieron de madres no tratadas, con PCR para *T. cruzi* positiva en sangre, pero negativa en leche materna; descartándose por tanto esta vía de transmisión.

De dos de los congénitos se dispuso de muestra de sangre de cordón, en uno de ellos la PCR fue positiva (congénito número 7, tabla IV.3); mientras que en otro la PCR en sangre de cordón fue negativa (congénito número 4, tabla IV.3) y se diagnosticó al mes de vida con un resultado de PCR positivo en sangre periférica. El tercer niño (congénito número 6, tabla IV.3) se diagnosticó con tres días de vida con un resultado de PCR positivo en sangre periférica. El cultivo fue positivo en dos de ellos (congénito 4 y 7) (los resultados del diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita se muestran en el apartado 4, tabla IV.3)

El resto de niños no infectados, obtuvieron un resultado de PCR negativo. La serología fue negativa a los 12 meses, descartándose la infección por *T. cruzi*.

Figura IV.10. Estudio parasitológico de las muestras de sangre y leche materna de las madres infectadas mediante la PCR *T. cruzi*.



Abreviaturas: C: leche sin hervir y sin tampón de lisis guanidina EDTA, C y H: leche hervida sin tampón de lisis guanidina EDTA, G y H: leche hervida y con tampón de lisis guanidina EDTA, NM: no muestra, PCR (+): resultado de PCR positivo, PCR (-): resultado de PCR negativo.

4. Diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

Para la detección de la transmisión vertical en niños nacidos de madres con serología positiva para *T. cruzi* se siguió el protocolo de diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, que incluye la realización de técnicas parasitológicas, moleculares y serológicas. Según los criterios diagnósticos de este protocolo, se consideró que el niño había adquirido la enfermedad de Chagas en los casos en los que el microhematocrito o la PCR en sangre periférica fue positivo antes de los 9-12 meses o bien si la serología se mantuvo positiva a partir de los 12 meses de vida (ver materiales y métodos, apartado 6.2).

El protocolo de diagnóstico se realizó en un total de 160 recién nacidos de madre con serología positiva para *T. cruzi*. De estos, 16 niños fueron diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita; dos de los niños infectados eran gemelos y otros tres niños infectados eran hermanos. En nuestro estudio la tasa de transmisión vertical fue del 10% (16 casos congénitos de 160 nacimientos de madres con serología positiva para *T. cruzi*). Once de estos niños fueron diagnosticados durante el primer año de vida por técnicas parasitológicas y/o moleculares; mientras que en 5 de ellos, debido a la falta de muestra en el momento del nacimiento, el diagnóstico se realizó con más de un año de edad mediante técnicas serológicas (tabla IV.3). Los 5 niños diagnosticados con más de un año de vida se consideraron casos congénitos, al haber nacido en España y no haber viajado a su país de origen antes de ser diagnosticados.

4.1. Sensibilidad, especificidad y rapidez diagnóstica de las técnicas empleadas:

- **Técnicas parasitológicas: microhematocrito**

El microhematocrito se realizó a 106 niños incluyendo a los 11 casos congénitos de los que se disponía de muestra durante el primer año de vida. La técnica fue positiva en uno de los niños congénitos en el que la muestra se tomó con un 1 día de vida (congénito número 3, tabla VI.3).

La técnica de microhematocrito mostró tener una buena especificidad ya que fue negativa en 95 niños que no adquirieron la infección (especificidad 100%). Por el contrario, solo uno de los 11 niños congénitos tuvo un resultado positivo en el microhematocrito, indicando una baja sensibilidad de la técnica (sensibilidad 9,1%).

- **Técnicas moleculares: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR en sangre periférica se realizó en 145 niños incluyendo a los 16 casos congénitos.

La PCR en sangre periférica fue positiva en todos los casos en los que se detectó transmisión vertical. La edad de los niños a la que se realizó el

diagnóstico mediante PCR dependió de la disponibilidad de muestra de sangre. En 6 niños, el diagnóstico se realizó con menos de un mes de vida [congénitos número 2 (1 mes), 3 (1 día), 4 (1 mes), 5 (20 días), 6 (3 días) y 7 (4 días) tabla IV.3]. En un niño el diagnóstico se realizó a los 2 meses (congénito número 1, tabla IV.3) y en 3 niños el diagnóstico por PCR se realizó a los 6 meses (congénitos número 8, 9 y 10, tabla IV.3). Por último, en uno de los casos el diagnóstico se realizó a los 12 meses (congénito número 11, tabla IV.3). Además, los 5 niños que fueron diagnosticados con más de un año de vida [congénitos número 12 (4 años), 13 (4 años), 14 (7 años), 15 (6 años) y 16 (5 años), tabla IV.3] también tuvieron un resultado de PCR positiva para *T. cruzi*.

La PCR mostró una excelente sensibilidad (100%). Fue positiva en los 16 casos congénitos, incluso en aquellos en los que el diagnóstico se realizó con más de un año de vida. La especificidad de la técnica fue del 100%, la PCR fue negativa en las muestras del resto de niños en los que la transmisión quedó descartada mediante serología (129 niños no infectados) (tabla IV.4). Además, permitió el diagnóstico precoz de 10 congénitos, de los que se dispuso de muestra de sangre periférica, antes del primer año de vida.

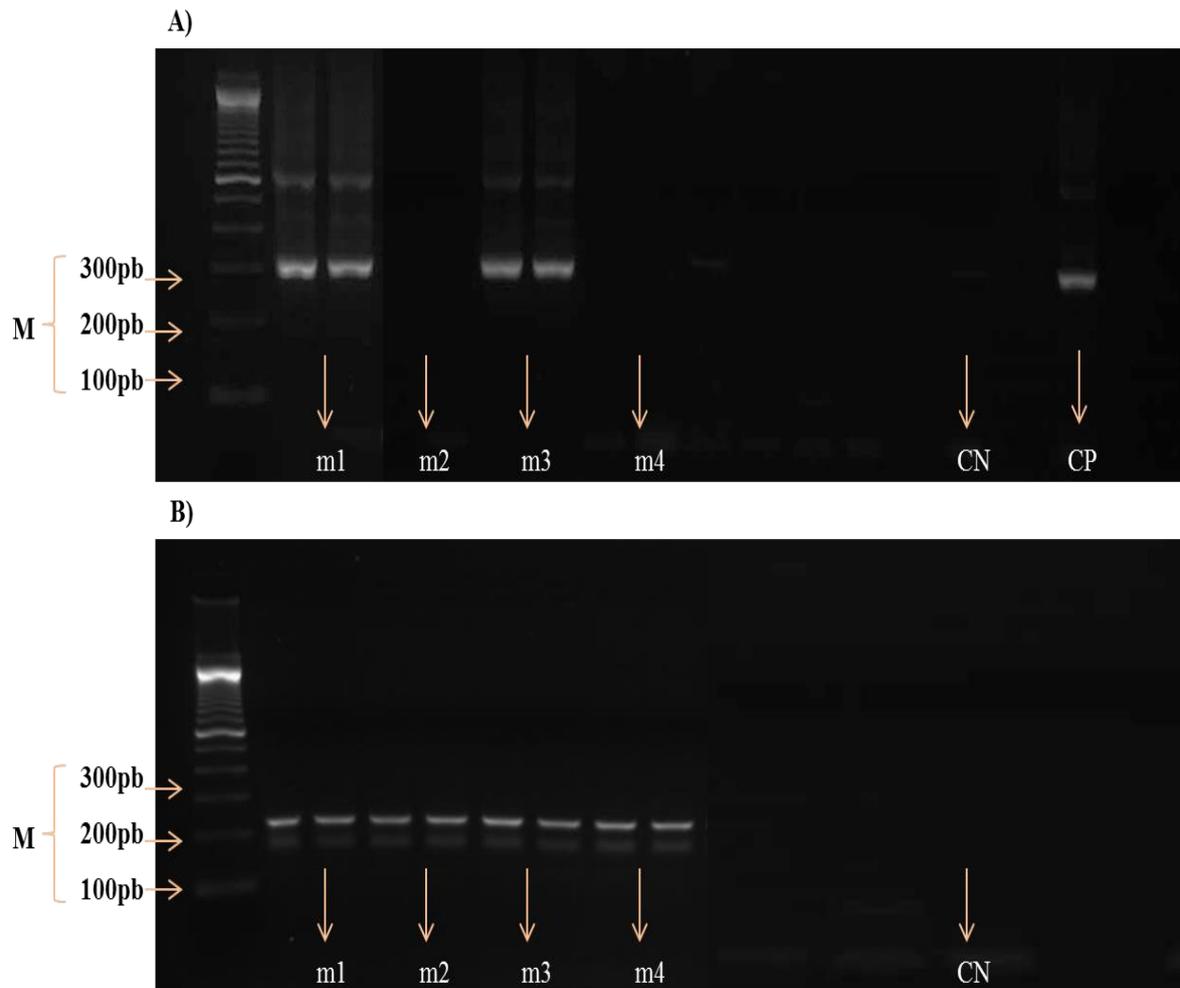


Figura IV.11. A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos O121/O122 que amplifican un fragmento de 330 bp del ADN del Kinetoplasto de *T. cruzi*. M, marcador de peso molecular de 100 pb, permite el cálculo del tamaño de los fragmentos de DNA amplificados; CN, control negativo; CP, control positivo, muestra de sangre de un paciente con resultado PCR positivo conocido; m1 y m3, muestras de niños positivas; m2 y m4, muestras de niños negativas. **B)** Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos REV/HUV que amplifican el fragmento de 220pb del ADN ribosómico, ADN endógeno utilizado como control interno. En las cuatro muestras (m1, m2, m3, m4) amplifica el control interno, indicando que la extracción del ADN ha sido adecuada. También se añade el control negativo (CN).

- **Técnicas serológicas: IFI y CMIA**

La serología se realizó a un total de 160 niños. De estos, en 144 el resultado fue negativo a los 12 meses de vida, descartándose el diagnóstico de enfermedad de Chagas congénita.

Las técnicas serológicas, tanto IFI como CMIA, fueron positivas en los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita. Estas técnicas tienen valor diagnóstico en los niños a partir de los 12 meses, momento en el que se ha producido el aclaramiento de los anticuerpos maternos. En nuestro estudio, la serología positiva presentó valor diagnóstico únicamente en los 6 niños que tenían un año o más de vida (congénitos número 11, 12, 13, 14, 15 y 16 tabla IV.3). Así, uno de los congénitos (congénito número 11) fue diagnosticado a los 12 meses al no haberse producido la caída del título de anticuerpos y obtener un resultado de PCR positivo. De los 14 niños de madres con enfermedad de Chagas a los que se les realizó el cribado con más de un año (material y métodos, apartado 6.3), 5 de ellos presentaron anticuerpos positivos frente a *T. cruzi* y fueron diagnosticados de Chagas congénito.

La serología permitió el diagnóstico de uno de los congénitos a los 12 meses de vida junto con la PCR y de los 5 congénitos diagnosticados con más de un año de vida, mostrando una buena sensibilidad (100%). El resto de niños no infectados, 144, obtuvieron un resultado serológico negativo, mostrando esta técnica una alta especificidad (100%) (tabla IV.4).

- **Cultivo del parásito:**

El cultivo de *T. cruzi* se realizó en los 11 niños diagnosticados durante del primer año de vida. Tras obtener un resultado positivo de PCR, la sangre se mandó al Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" para realizar el cultivo de *T. cruzi*. El cultivo fue positivo en 7 de ellos, mostrando esta técnica una baja sensibilidad (63.6%) (los resultados del cultivo del parásito se muestran en la tabla IV.3)

Tabla IV.3. Técnicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

CONGÉNITOS	EDAD AL DIAGNÓSTICO, EN MESES	CULTIVO	0-2 MESES DE EDAD				6 MESES DE EDAD				12 MESES DE EDAD				>1 DE UN AÑO DE EDAD				
			IFI	ELISA	PCR	MHC	IFI	ELISA	PCR	MHC	IFI	ELISA	PCR	MHC	IFI	ELISA	PCR	MHC	
1	2	+	+	+	+	-													
2	1	-	+	+	+	-													
3	0	+	+	+	+	+													
4	1	+	+	+	+	-													
5	0	+	+	+	+	-													
6	0	-	+	+	+	-													
7**	0	+	+	+	+	-													
8*	6	+					+	+	+	-									
9*	6	+					+	+	+	-									
10	6	-					+	+	+	-									
11	12	+									+	+	+	-					
12	48	NR														+	+	+	NR
13	48	NR														+	+	+	NR
14	84	NR														+	+	+	NR
15**	72	NR														+	+	+	NR
16**	60	NR														+	+	+	NR

El símbolo más (+) indica resultado positivo, y el símbolo menos (-) resultado negativo. Abreviaturas: IFI, inmunofluorescencia indirecta; CMIA, quimioluminiscencia de micropartículas; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; MHC, microhematocrito; NR, no realizado.

*Los congénitos número 8 y 9 son hermanos gemelos.

**Los congénitos 7, 15 y 16 son hermanos

Tabla IV.4. Sensibilidad y especificidad de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

	N° total de Niños estudiados	Sensibilidad IC 95%	Especificidad IC95%	VPP IC95%	VPN IC95%
PCR*	145	100 (80,6- 100)	100 (97,1-100)	100 (80,6-100)	100 (97,1-100)
Microhematocrito	106	9,1 (1,6-37,7)	100 (96,1-100)	100 (20,7-100)	90,5 (83,4-94,7)
Serología**	150	100 (61-100)	100 (97,4-100%)	100 (61-100)	100 (97,4-100%)

Abreviaturas: IC95%, intervalo de confianza al 95%; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

*Los resultados obtenidos son de la técnica de PCR en sangre periférica

** La serología se considera prueba diagnóstica en los 6 niños congénitos diagnosticados a partir del año de vida.

4.2. Muestras empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita mediante PCR

Con la finalidad de establecer cuál es el tipo de muestra más adecuada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita se llevó a cabo la detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR en sangre de cordón y en los tejidos de placenta y cordón umbilical. Los resultados de PCR se compararon con los obtenidos en sangre periférica.

Sangre de cordón: Se dispuso de muestras de sangre de cordón de 46 recién nacidos, dos de ellos resultaron infectados y los 44 restantes no infectados.

La PCR en sangre de cordón fue positiva en dos recién nacidos: uno de ellos fue diagnosticado como congénito (congénito número 7), se confirmó el diagnóstico con una segunda muestra en sangre periférica del recién nacido positiva (a los 4 y a los 15 días de vida); mientras que en el otro recién nacido, las muestras de sangre periférica obtenidas a los 15 días y al mes fueron PCR negativas y la serología negativizó a los 12 meses, por lo que se consideró un falso positivo.

Solo uno de los dos congénitos de los cuales se dispuso de muestra de sangre de cordón obtuvo un resultado de PCR positivo (congénito número 7), en el otro congénito (congénito número 4) la sangre de cordón fue negativa y el diagnóstico se realizó a los 15 días al obtener un resultado de PCR positivo en sangre periférica (confirmándose con una segunda PCR positiva al mes); considerándose un falso negativo en sangre de cordón.

Los otros 43 recién nacidos no infectados, obtuvieron un resultado de PCR en sangre de cordón negativo y se confirmaron con una segunda PCR en sangre periférica negativa y la negativización de la serología en todos ellos (los resultados de sensibilidad y especificidad de la PCR en sangre de cordón se muestran en la tabla tabla IV.5).

Placenta y cordón umbilical: En 33 mujeres se siguió el protocolo de paritorio en gestante con enfermedad de Chagas, tomándose en el momento del parto muestra de tejido de placenta y cordón umbilical para la detección de *T. cruzi* mediante PCR (material y métodos, apartado 6.8).

De las 33 muestras disponibles, una fue de uno de los embarazos en los que se produjo transmisión vertical de *T. cruzi* de la madre al recién nacido, en las 32 restantes no hubo transmisión de la infección al recién nacido.

En el recién nacido que adquirió la infección (congénito número 7), la PCR de *T. cruzi* en los tejidos de placenta y cordón umbilical fueron positivas (figura IV.12). De los 32 recién nacidos que no resultaron infectados, la PCR fue positiva en tejido de placenta en dos casos donde no ocurrió transmisión vertical y negativa en los 30 restantes. Y en tejido de cordón umbilical, la PCR fue positiva en uno de los niños no infectados y negativa en los 31 restantes. El recién nacido en el que la PCR en tejido de cordón umbilical fue positiva también tuvo un resultado de PCR positivo en muestra de placenta, a pesar de que el niño no adquirió la infección (tabla IV.5).

Tabla IV.5. Sensibilidad y especificidad de la técnica de PCR en muestras de sangre de cordón, tejido de placenta y tejido de cordón umbilical.

PCR	Nº total de muestras	Sensibilidad IC 95%	Especificidad IC95%	VPP IC95%	VPN IC95%
Sangre de cordón	46	50 (9,5-90,5%)	97,7 (82,2-99,6%)	50 (9,5-90,5%)	97,7 (82,2-99,6%)
Tejido de placenta	33	100 (20,7-100%)	93,8% (79,9-98,3%)	33,3 (6,1-79,2%)	100 (88,6-100%)
Tejido de cordón umbilical	33	100 (20,7-100%)	96,9 (84,3-99,4%)	50 (9,5-90,5%)	100 (89-100%)

Abreviaturas: IC95%, intervalo de confianza al 95%; VPP, valor predictivo positivo; VPN, valor predictivo negativo.

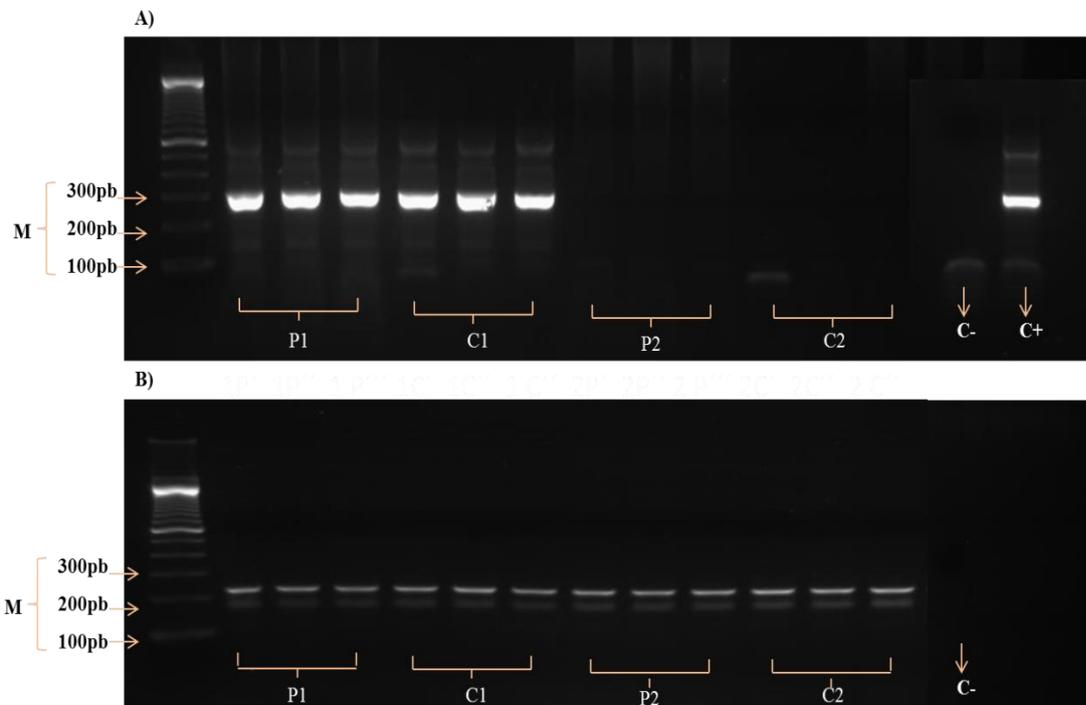


Figura IV.12. A) Electroforesis en gel de agarosa al 2% del producto de PCR de las muestras de placenta y cordón umbilical obtenido con los oligonucleótidos O121/O122 que amplifican un fragmento de 330 bp del ADN del Kinetoplasto de *T. cruzi*. M: marcador de peso molecular de 100 pb. CN: control negativo. CP: control positivo. P1 y C1: son los amplificados de placenta y cordón umbilical (extraídos por triplicado) del congénito 7, que fueron positivos. P2 y C2: amplificados de placenta y cordón umbilical negativos. B) Control interno de los extraídos de placenta y condón umbilical. Todos (P1, C1, P2 y C2) amplifican a 220pb, indicando que la extracción del ADN ha sido adecuada.

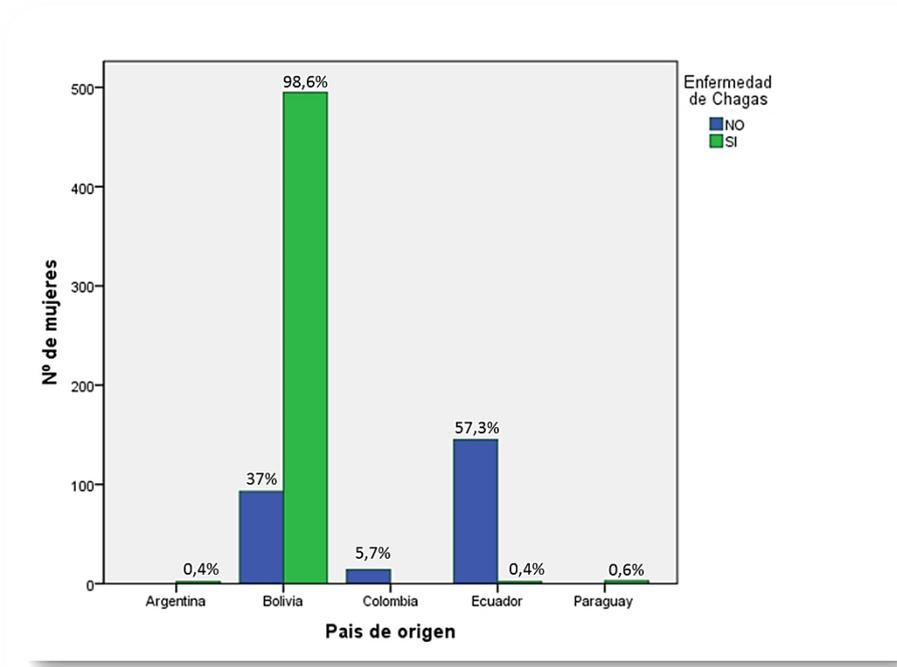
5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas

5.1. Abortos espontáneos

La enfermedad de Chagas en la mujer embarazada se ha asociado a un mayor riesgo de padecer abortos espontáneos. Para esclarecer este hecho, estudiamos la aparición de abortos espontáneos en 502 mujeres con enfermedad de Chagas, y lo comparamos con un grupo control de 252 mujeres latinoamericanas sin enfermedad de Chagas (material y métodos, apartado 6.9).

En cuanto a los datos epidemiológicos, observamos que la mayoría de mujeres latinoamericanas infectadas procedían de Bolivia (495; 98,6%), mientras que las no infectadas procedían tanto de Ecuador (145; 57,3%), como de Bolivia (93; 37%). En la figura IV.13 se muestran las diferencias en el país de procedencia de las mujeres latinoamericanas en función de si estaban o no infectadas.

Figura IV.13. País de procedencia de las mujeres latinoamericanas con y sin enfermedad de Chagas.



Factores de riesgo y prevención primaria de la enfermedad de Chagas congénita

Los dos grupos eran comparables en cuanto a edad y años en España, no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos ($p > 0,05$).

El número de abortos espontáneos entre las mujeres con enfermedad de Chagas oscilo entre 1 y 6, mientras que en las mujeres sin enfermedad de Chagas oscilo entre 1 y 4. El 36,7% de las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas habían sufrido abortos espontáneos, frente al 35,3% de las mujeres latinoamericanas sin enfermedad de Chagas. No se encontró una relación estadísticamente significativa entre la enfermedad de Chagas y el hecho de haber sufrido un mayor número de abortos espontáneos ($p = 0,719$). Aunque si consideramos las categorías de 1 a 2 abortos espontáneos y más de tres abortos espontáneos, observamos que un 2% las mujeres con enfermedad de Chagas han sufrido más de 3 abortos espontáneos, frente al 0,8% de las que no tienen enfermedad de Chagas; aunque en este caso tampoco existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,458$) (tabla IV.6).

Cuando el análisis se realizó teniendo en cuenta el país de procedencia, no se encontró una diferencia significativa en el número de abortos espontáneos entre las mujeres latinoamericanas con y sin enfermedad de Chagas ($p > 0,05$).

Tabla IV.6. Relación entre las mujeres latinoamericanas con enfermedad de Chagas y la aparición de abortos espontáneos.

		Enfermedad de Chagas			
		No		Si	
		N	%	N	%
Abortos espontáneos	No abortos	163	64,7	318	63,3
	1 - 2 abortos	87	34,5	174	34,7
	> 3 abortos	2	0,8	10	2

5.2. Enfermedad de Chagas congénita sintomática o asintomática.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita pueden darse en el momento del nacimiento: bajo peso al nacer, bajo índice de APGAR o prematuridad; o días después del nacimiento: hepatoesplenomegalia, anemia, ictericia, miocarditis y distrés respiratorio.

Los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas fueron sometidos a una anamnesis exhaustiva para evaluar posibles manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita.

Se recogieron los datos del nacimiento: tipo de parto (eutócico o cesárea), peso (se considera bajo peso al nacer, por debajo de 2,5 g), prematuridad (cuando el recién nacido nace antes de las 37 semanas de embarazo) y APGAR (es un examen rápido que se realiza al primer y quinto minuto después del nacimiento del recién nacido. La puntuación en el minuto 1 determina como toleró el recién nacido el proceso de nacimiento y la puntuación en el minuto 5 le indica al médico como está evolucionando el recién nacido fuera del vientre materno). Además de la exploración, se les realizó una analítica completa y un electrocardiograma.

En cuanto al tipo de parto de los 16 niños diagnosticados como congénitos, el 56,3% (9/16) nacieron mediante partos eutócicos y el 43,7% (7/16) nacieron mediante cesárea.

Tres de los niños (18,8%), presentaron manifestaciones clínicas asociadas a la enfermedad de Chagas congénita. Dos de ellos eran hermanos gemelos (congénito número 8 y 9, tabla IV.7), ambos prematuros; uno de ellos (congénito número 8) presentó bajo peso al nacer (1340g), hepatoesplenomegalia, distrés respiratorio, ictericia y miocarditis; el otro (congénito número 9) no presentó un cuadro tan severo pero también curso con bajo peso al nacer (1340g) y hepatoesplenomegalia. El tercer niño sintomático (congénito número 3) presentó un test de APGAR 3 y 6 al nacimiento (1 y 5 minutos), bajo peso al nacer (2450g), hepatoesplenomegalia, distrés respiratorio, anemia, ictericia y fallo cardíaco (tabla IV.7).

Los 13 congénitos restantes (81,2%) no mostraron ninguna manifestación clínica de enfermedad de Chagas congénita, considerándose asintomáticos.

Factores de riesgo y prevención primaria de la enfermedad de Chagas congénita

Tabla IV.7. Manifestaciones clínicas de los niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita.

CONGÉNITO	TIPO DE PARTO	PESO (g)	PREMATURIDAD	APGAR	SINTOMATOLOGÍA
1	cesárea	3450	NO	9/10	NO
2	eutócico	3970	NO	9/10	NO
3	cesárea	2450	NO	3/6	SI
4	cesárea	3660	NO	10/10	NO
5	eutócico	4030	NO	9/10	NO
6	cesárea	3030	NO	9/10	NO
7	cesárea	2925	NO	9/10	NO
8	eutócico	1340	SI	9/10	SI
9	eutócico	1340	SI	9/10	SI
10	eutócico	4380	NO	9/10	NO
11	eutócico	3840	NO	10/10	NO
12	eutócico	3080	SI	9/10	NO
13	eutócico	3950	NO	9/10	NO
14	eutócico	3700	NO	9/10	NO
15	cesárea	3300	NO	9/10	NO
16	cesárea	3200	NO	9/10	NO

6. Tratamiento de los niños con enfermedad de Chagas congénita: seguimiento serológico y por PCR post-tratamiento.

Los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita fueron tratados con beznidazol por vía oral, 10 mg/kg de peso corporal/día en tres tomas diarias durante 60 días. Todos ellos mostraron una buena tolerancia al tratamiento, no observándose ninguna reacción adversa al mismo (material y métodos, apartado 5).

Al finalizar el tratamiento se realizó un seguimiento serológico y molecular a los 60-90 días, 150 días y anualmente, hasta la negativización de la serología. Considerándose que el niño se había curado cuando se obtuvo un resultado negativo en dos serologías consecutivas (protocolo de diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la enfermedad de Chagas congénita, figura III.2.)

En uno de los niños (congénito número 2, tabla IV.8) se perdió el seguimiento tras iniciar tratamiento al regresar a su país de origen, Bolivia.

Dos de los niños (congénito número 15 y 16, tabla IV.8) continúan en seguimiento, no se dispone aún de datos de los controles post-tratamiento.

Por lo tanto, de los 16 niños diagnosticados y tratados de enfermedad de Chagas congénita, disponemos de datos de seguimiento serológico y molecular de 13 de ellos. Diez de ellos fueron diagnosticados y tratados antes del año de vida (congénito de número 1 al número 11, tabla IV.8), frente a tres que fueron diagnosticados y tratados con más de un año de vida (congénito número 12, 13 y 14, tabla IV.8). A continuación se detalla el seguimiento por PCR y serología de cada uno de ellos:

Congénito número 1: Fue diagnosticado con dos meses de vida con resultados de PCR y serología positivos. Tras el tratamiento la PCR negativiza en el control de 60 días. La serología no negativizó hasta el control de los 150 días post-tratamiento; manteniéndose el resultado de PCR negativo en este segundo control. Esto indica que el niño se ha curado.

Congénito número 3: Fue diagnosticado con un día de vida (resultados de PCR y serología positivos). Tras el tratamiento, tanto la PCR como la serología negativizan en

el control de los 60 días. Los resultados de ambas pruebas fueron negativos en el control de los 150 días, lo cual indicó la cura del niño.

Congénito número 4: Fue diagnosticado con un mes de vida con resultados de PCR y serología positivos. Tras el tratamiento la PCR negativiza en el control de 60 días. Los resultados negativos de serología en el control anual post-tratamiento (el control de los 150 días post-tratamiento no se realizó) confirmaron que el niño se había curado.

Congénito número 5: Fue diagnosticado con veinte días de vida con resultados de PCR y serología positivos. Tras el tratamiento la PCR negativiza en el control 60 días. La serología negativiza en el control anual post-tratamiento (el control de los 150 días post-tratamiento no se realizó). Esto indicó que el niño se había curado.

Congénito número 6: Fue diagnosticado con tres días de vida con resultados de PCR y serología positivos. Tras el tratamiento la PCR negativiza en el control de 60 días y la serología en el control de 150 días post-tratamiento; manteniéndose el resultado de PCR negativo. Esto indicó que el niño se había curado.

Congénito número 7: Fue diagnosticado en el momento de nacimiento. Los resultados de serología y PCR en sangre de cordón fueron positivos (y fue confirmado posteriormente en sangre periférica). Tras el tratamiento la PCR fue negativa en el control de 60 días y la serología negativizó en el control de los 150 días post-tratamiento; manteniéndose el resultado de PCR negativo en este control. Esto indicó que el niño se había curado.

Congénito número 8: Fue diagnosticado con seis meses de vida, resultados de serología y PCR positivos. Tras el tratamiento la PCR fue negativa en el control de 60 días. No se tienen datos de serología hasta el control anual post-tratamiento en el que tanto PCR como la serología fueron negativos, indicando que el niño se había curado.

Congénito número 9: Fue diagnosticado con seis meses de vida con resultados de serología y PCR positivos. Tras el tratamiento la PCR negativiza en el control de 60 días, pero en el control de los 150 días post-tratamiento la PCR volvió a ser positiva. La serología se mantuvo positiva a los 60 y 150 días post-tratamiento. Tras detectarse el fracaso terapéutico mediante PCR (el tratamiento no había sido administrado correctamente al niño), se administró al congénito un segundo ciclo de beznidazol. Tras

completar el tratamiento, los resultados de PCR fueron negativos en el control de los 60 días post-tratamiento, manteniéndose negativos en el control de los 150 días y control anual post-tratamiento. La serología negativizó en el control de los dos años post-tratamiento, momento en el que se consideró al niño curado de la infección.

Congénito número 10: Fue diagnosticado con seis meses de vida con resultados de PCR y serología positivos. Tras el tratamiento, tanto la PCR como la serología fueron negativos en el control de los 60 días manteniéndose negativos los resultados de ambas pruebas en el control de 150 días. Esto indicó que el niño se había curado.

Congénito número 11: Fue diagnosticado con doce meses de vida con resultados de serología y PCR positivos. Tras el tratamiento, la PCR negativiza en el control de los 60 días y se mantiene negativa durante el seguimiento. En el control de los 150 días post-tratamiento la serología continuó siendo positiva; hasta el control anual no se produce la eliminación de los anticuerpos, momento en el que se confirmó la cura del niño.

Congénito número 12: Fue diagnosticado con 4 años de vida con resultados de serología y PCR positivos. El resultado de la PCR fue negativo en el control anual post-tratamiento (no se tienen datos del control de PCR a los 60 días, ni de los 150 días post-tratamiento) y la serología continuó siendo positiva en el control anual post-tratamiento respecto al inicio (no se tienen datos del control serológico a los 150 días post-tratamiento). La PCR permitió detectar un fracaso terapéutico al positivizar en el control del tercer año post-tratamiento. Al detectarse el fracaso terapéutico, el congénito vuelve a ser tratado y en este caso sí que completa tratamiento; negativizando la PCR en el control de los 60 días post-tratamiento (no se tienen datos del control de PCR a los 150 días, ni al año post-tratamiento). La presencia de anticuerpos en el control anual post-tratamiento indicó que no se ha curado de la infección y continúa en seguimiento.

Congénito número 13: Fue diagnosticado con 4 años de vida con resultados de serología y PCR positivos. Los resultados de PCR fueron negativos en el control anual post-tratamiento (no se tienen datos del control de PCR a los 60 días, ni de los 150 días post-tratamiento), y se mantuvieron negativos en los controles realizados hasta el momento (resultado de PCR negativo en el control del tercer año pos-tratamiento). La

serología se mantiene positiva durante los 3 años post-tratamiento. Por lo tanto, no se puede considerar al niño curado de la infección y continúa en seguimiento.

Congénito número 14: Fue diagnosticado con 7 años de vida con resultados de serología y PCR positivos. La PCR negativizó en el control de los 60 días post-tratamiento y se mantuvo así en el control del primer y segundo año pos-tratamiento (no se tienen datos del control de PCR a los 150 días). La serología se mantiene positiva en el control de primer y segundo año post-tratamiento. Estos datos implican que el niño no se ha curado de la infección y continúa en seguimiento.

En resumen, en el primer control después del tratamiento (60-90 días) el 100% de los pacientes tuvo un resultado de PCR negativo. Esta técnica permitió determinar la acción del beznidazol. Ya que, tras el tratamiento, se observó en los pacientes una disminución en la carga parasitaria hasta niveles indetectables mediante PCR, resultando una herramienta útil para determinar a corto plazo la eficacia del tratamiento con beznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas congénita. Los resultados de PCR fueron negativos durante el seguimiento excepto en 2 pacientes que no habían tomado correctamente el tratamiento, por tanto, esta técnica resultó ser una herramienta útil para la detección precoz de fracasos terapéuticos.

La serología fue negativa en todos los casos congénitos diagnosticados durante el primer año de vida. En algunos de los niños los anticuerpos descendieron rápidamente hasta valores negativos antes de los 12 meses de vida (congénito número 1, 3, 6, 7 y 10). Sin embargo, la serología se mantuvo positiva en los casos congénitos en los que el diagnóstico se realizó después de los 12 meses, lo que hace necesario continuar su seguimiento para confirmar la eficacia del tratamiento.

Tabla IV.8. Diagnóstico y seguimiento post-tratamiento por PCR y serología de los niños infectados

Niños	Edad al diagnóstico, en meses	Antes del tratamiento			60-90 días después del tratamiento			150 después del tratamiento			1 año después del tratamiento			2 años después del tratamiento			3 años después del tratamiento			
		IFI	CMIA	PCR	IFI	CMIA	PCR	IFI	CMIA	PCR	IFI	CMIA	PCR	IFI	CMIA	PCR	IFI	CMIA	PCR	
1	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	
2*	1	+	+	+																
3	0	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	1	+	+	+	+	+	-	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	
5	0	+	+	+	NR	+	-	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	0	+	+	+	NR	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	0	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	6	+	+	+	NR	NR	-	NR	NR	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
9	6	+	+	+	+	+	-	+	+	+										
9**					NR	+	-	NR	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	NR	
10	6	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NR	
11	12	+	+	+	NR	NR	-	+	+	NR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
12	48	+	+	+	NR	+	NR	NR	NR	NR	+	+	-	NR	NR	NR	NR	NR	+	+
12**					NR	NR	-													
13	48	+	+	+	NR	+	NR	NR	+	NR	+	+	-	NR	+	NR	NR	NR	+	-
14	84	+	+	+	NR	NR	-	NR	NR	NR	NR	+	-	NR	+	-	-	-	-	-
15***	72	+	+	+																
16***	60	+	+	+																

El símbolo más (+) indica resultado positivo; el símbolo menos (-) indica resultado negativo.

Abreviaturas: CMIA, inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas; IFI, ensayo de inmunofluorescencia indirecta; NR, no realizado; PCR, reacción en cadena de la polimerasa.

* Pérdida de seguimiento: el niño regresó a Bolivia

** Los niños 9 y 12 fueron seguidos dos veces tras su primer tratamiento. El fracaso terapéutico se diagnosticó con un resultado de PCR positivo a los 150 días en el congénito número 9 y a los 3 años en el congénito número 12, fueron tratados de nuevo y se realizó el seguimiento post-tratamiento por segunda vez.

*** Niños tratados recientemente, aún no se han realizado los controles post-tratamiento.

V. DISCUSIÓN

La enfermedad de Chagas ha emergido como un importante problema de salud pública en áreas donde la infección no es endémica, como es nuestro país, debido a los movimientos migratorios. Dónde la principal vía de transmisión, es la transmisión vertical, de madres a niños; perpetuándose de esta forma la enfermedad fuera de área endémica.

Concretamente, en la Región de Murcia, actualmente residen unas 48.000 personas procedentes de América del Sur, lo que constituye el 3,3% de la población total de la Región. Esta población incluye 16.300 mujeres sudamericanas en edad fértil y el 25% de ellas son de origen boliviano (CREM, 2016). Según los estudios realizados en España sobre las seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas, principalmente de origen boliviano, cabe esperar que aproximadamente un 3% de ellas estén infectadas (Howard *et al.*, 2014). Esto hace que en nuestra región exista un importante foco para la enfermedad de Chagas, lo que constituye un problema sanitario que debe ser abordado.

Esta situación se refleja en los datos obtenidos en nuestro estudio, en el cual se detectó una tasa de transmisión vertical del 10%. Esta tasa de transmisión fue superior a la descrita en un reciente meta-análisis (Howard *et al.*, 2014), donde se estima que el riesgo de transmisión congénita en los niños nacidos de madres con enfermedad de Chagas se sitúa alrededor del 5%. Sin embargo, este porcentaje varía notablemente entre las distintas áreas geográficas, habiéndose descrito tasas de transmisión vertical más elevadas (1-12%) en determinadas regiones de Bolivia, Chile y Paraguay; y tasas menores (1-2%) en el resto de los países endémicos (Howard *et al.*, 2014). Estas diferencias en la tasa de transmisión se podrían atribuir a el estado inmunológico de las madres, a factores placentarios, al tipo de cepa de *T. cruzi* y al estado inmunológico del recién nacido; así como, a las técnicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Rassi *et al.*, 2010).

Cabe destacar, que dado que el estudio se ha realizado fuera de área endémica, no existe la posibilidad de transmisión vectorial, ni por tanto el riesgo de reinfección; esto facilita el análisis de los datos y el diagnóstico de los casos de enfermedad de Chagas congénita.

1. Factores de riesgo implicados en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.

Se han descrito diferentes factores de riesgo que podrían estar implicados en la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi*, estos están relacionados con el estado materno (estado parasitológico, inmunológico, historia obstétrica y datos epidemiológicos), el parásito (genotipo y carga parasitaria) y el estado del recién nacido (estado inmunológico) (Schijman, 2006; Cevallos y Hernández, 2014). Nuestro trabajo se centra fundamentalmente en el estudio de los factores de riesgo relacionados con el estado materno y la carga parasitaria.

En nuestro estudio, un 10% de las madres crónicamente infectadas, transmitieron la infección a sus recién nacidos. De este modo, 13 de las 144 madres transmitieron la infección y dieciséis de 160 niños resultaron infectados. Una de las madres dio a luz a gemelos, ambos adquirieron la infección, y otra de las madres dio a luz a tres niños infectados en tres partos sucesivos. El acumulo de casos de enfermedad de Chagas en los miembros de una misma familia, conocido como *family clustering*, ya ha sido descrito por diferentes autores (Freilij y Altcheh, 1995; Sánchez-Negrette *et al.*, 2005; Bisio *et al.*, 2011), lo que pone de manifiesto la implicación de factores genéticos en la transmisión congénita. Así como, también se ha descrito el embarazo gemelar como un factor de riesgo implicado en la transmisión (Sánchez-Negrette *et al.*, 2005; Bisio *et al.*, 2011; Kaplinski *et al.*, 2015).

La cepa de *T. cruzi* aislada en los 8 casos congénitos en los que el cultivo fue positivo fue TcV. Este genotipo de *T. cruzi* junto al TcII, son los más frecuentemente identificados en los casos de enfermedad de Chagas congénita. El genotipo TcV se ha aislado prácticamente en el 100% de los casos de Chagas congénito descritos en Bolivia, Argentina, sur de Brasil, Chile y Paraguay. El papel del genotipo en la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi* no ésta claro, pero parece estar relacionado con el genotipo más prevalente en el área donde nace el recién nacido (Virreira *et al.*, 2006, 2007; Burgos *et al.*, 2007; García *et al.*, 2014). Así, en nuestro caso el genotipo aislado, TcV, es el más prevalente en la región de Bolivia; país del que provienen las madres que transmitieron la infección. Sin embargo, no hemos identificado el genotipo de *T. cruzi* presente en las madres. Por tanto, no podemos

establecer si existe una relación entre el genotipo TcV y la transmisión vertical. Aunque en modelos animales se ha probado que las diferentes cepas de *T. cruzi* muestran una diferente capacidad para invadir la placenta y producir la infección congénita (Andrade, 1982; Solana *et al.*, 2002), este hecho no ha sido demostrado en seres humanos.

1.1. Factores epidemiológicos: País y región de origen, edad y años de residencia en España.

En cuanto al país de procedencia, todas las madres que transmitieron la infección procedían de Bolivia, de los departamentos de Cochabamba (46,2%), Santa Cruz (38,5%) y Chuquisaca (15,3%); no detectándose diferencias significativas entre el país y el departamento de origen con el riesgo de transmisión. Aunque hay que tener en cuenta que la mayoría de las madres latinoamericanas incluidas en nuestro estudio eran bolivianas, país en el que se han descrito las mayores prevalencias de enfermedad de Chagas (Rassi *et al.*, 2010). Los resultados mostraron que las mujeres más jóvenes dan a luz más frecuentemente niños con enfermedad de Chagas. Aunque esta tendencia no llega a ser estadísticamente significativa ($p = 0,06$), probablemente por el reducido tamaño muestral de madres que transmiten la infección. La relación entre la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas y la edad ha sido demostrado en trabajos previos, en los que las madres más jóvenes presentaron mayor riesgo de transmitir la infección a sus recién nacidos (Torrico *et al.*, 2004; Kaplinski *et al.*, 2015). El tiempo de estancia en zona no endémica ha sido otro de los factores epidemiológicos analizado en nuestro estudio. Se analizó si existía diferencia de años de residencia en España en las madres que transmitieron frente las que no transmitieron la infección. Empleando este dato como un indicador del tiempo transcurrido desde que adquirieron la infección, ya que, al encontrarnos fuera de área endémica no es posible la reinfección. Detectamos que las mujeres que transmitieron la infección tenían una estancia significativamente más corta en nuestro país, que las que no transmitieron la infección ($p = 0,005$). Este dato podría indicar que al haber transcurrido menos tiempo desde que adquirieron la infección, las madres presentan parasitemias más elevadas. En este sentido, se ha descrito un mayor porcentaje de resultado de PCR positivos en sangre periférica entre pacientes que habían residido un menor tiempo en nuestro país (Murcia *et al.*, 2010). No obstante, la media

de años de estancia en España en ambos grupos de madres superaba los tres años, indicando una estancia prolongada en nuestro país.

1.2 Parasitemia detectada mediante PCR de *T. cruzi* en las madres.

1.2.1 Estado parasitológico de las madres durante el embarazo

El incremento de la parasitemia que se produce durante el embarazo, especialmente durante el tercer trimestre, favorece la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi* (Brutus *et al.*, 2010). El nivel de parasitemia durante el período de gestación ha sido previamente estudiado mediante la técnica del microhematocrito (Brutus *et al.*, 2010) y la técnica de PCR (Muñoz *et al.*, 2009), sin embargo dichos estudios carecen de un grupo control. En nuestro estudio se analizó el estado parasitológico de las mujeres con enfermedad de Chagas embarazadas mediante PCR incluyendo además un grupo control de mujeres latinoamericanas seropositivas no embarazadas. Los resultados mostraron que el 65,5% de mujeres embarazadas tenían resultado de PCR positivo, frente al 48% de mujeres no embarazadas. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre el embarazo y el incremento de parasitemia detectado mediante PCR; y con ello un mayor riesgo de transmisión vertical de la infección ($p = 0,005$). Este fenómeno se debe probablemente al estado de inmunosupresión inducido por el propio embarazo, para evitar el rechazo fetal (Hermann *et al.*, 2004).

1.2.2 Valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical

La parasitemia en la mujer embarazada es uno de los principales factores que ésta claramente asociado a un mayor riesgo de transmisión vertical. Se ha descrito que durante la infección aguda, fase de la enfermedad en la que la parasitemia es persistente, la tasa de transmisión vertical es aproximadamente del 50% (Bittencourt, 1992; Moretti *et al.*, 2005; Salas *et al.*, 2007). La tasa de transmisión vertical alcanza el 100% en las madres coinfectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), en las que se produce la reactivación de la enfermedad de Chagas durante el embarazo (Freilij *et al.*,

1995; Scapellato *et al.*, 2009). Durante la fase crónica, pese a ser asintomática, existe una parasitemia intermitente; y por lo tanto, también existe riesgo de transmisión. Sin embargo, el porcentaje de transmisión descrito en las madres con enfermedad de Chagas crónica es aproximadamente del 5%, siendo significativamente menor al descrito durante la fase aguda. En nuestro trabajo la tasa de transmisión vertical fue del 10%. Los datos descritos en los diferentes estudios realizados oscilan entre el 0,75% y el 28,6% (Howard *et al.*, 2014).

La parasitemia durante el embarazo en mujeres con enfermedad de Chagas en fase crónica y su relación con la transmisión vertical de la infección ha sido previamente estudiada, empleando diferentes técnicas para detectar el parásito en sangre como son el xenodiagnóstico (Menezes *et al.*, 1992), microhematocrito (Salas *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2010), el hemocultivo (Hermann *et al.*, 2004; Siriano *et al.*, 2011) y la PCR (Bern *et al.*, 2009; Bisio *et al.*, 2011; Bua *et al.*, 2012). En nuestro trabajo, se analizó la parasitemia mediante PCR, asociándose la detección de la parasitemia con un mayor riesgo de transmisión vertical de la infección en zona no endémica donde posibilidad de infección vectorial en el recién nacido esta descartada. Esta técnica se realizó en el tercer trimestre de embarazo o post-parto reciente para establecer el valor predictivo de la PCR en la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi*. Todas las madres que transmitieron la infección a sus recién nacidos, presentaron un resultado de PCR positivo durante el embarazo, siendo el valor predictivo positivo de la PCR en la transmisión vertical de 18,8% (16 niños infectados de 85 embarazos de madres con resultado de PCR positivo). Mientras que, ninguna de las madres con resultado de PCR negativo durante el embarazo transmitió la infección, obteniendo la técnica de PCR un valor predictivo negativo del 100% (ningún niño infectado de 74 embarazos de madres con resultado negativo de PCR). Los resultados obtenidos indican que la parasitemia detectada durante el embarazo mediante PCR es un factor de riesgo implicado en la transmisión vertical ($p = 0,0001$), como ya ha sido descrito previamente por otros autores (Bern *et al.*, 2009; Bisio *et al.*, 2011; Kaplinski *et al.*, 2015) y por nuestro grupo de trabajo (Murcia *et al.*, 2013; 2017). Por otra parte, cabe resaltar de nuestro estudio el valor predictivo negativo de la PCR (Murcia *et al.*, 2017), ya que, ninguna madre embarazada con resultado de PCR negativo transmitió la infección a su recién nacido. Estos resultados refuerzan la importancia de incorporar la técnica de PCR en el cribado de las mujeres embarazadas con enfermedad de Chagas. Ya que, la parasitemia

detectada mediante PCR en el embarazo debe ser considerada un factor de riesgo de la enfermedad de Chagas congénita. Por tanto, los niños de madres con resultado de PCR positivo requerirán un seguimiento más exhaustivo. Mientras que, en los niños de madres con resultado de PCR negativo se considerará que tienen un riesgo muy bajo de adquirir la enfermedad de Chagas congénita.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los que no se detectó ningún caso de enfermedad de Chagas congénita entre las madres con resultado de PCR negativo y que ningún niño con un resultado de PCR negativo resultó infectado, proponemos un cambio en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (figura V.1).

De este modo, en el algoritmo que proponemos la PCR se realizará a todas las madres embarazadas con enfermedad de Chagas en el tercer trimestre del embarazo o post-parto reciente. Los niños de madres con resultado de PCR negativo durante el embarazo, deben ser considerados como no infectados. En el caso de que la madre tenga un resultado de PCR positivo durante el embarazo, se le debe realizar la PCR al niño inmediatamente después de nacimiento y se repetirá 2-3 semanas después para confirmar el resultado. En el caso de niños de madres con resultado de PCR negativo durante el embarazo, o niños de madres con resultado de PCR positivo durante el embarazo pero que han tenido dos resultados de PCR negativos al nacimiento; se considera la realización de un control serológico a los 9-12 meses de vida para confirmar la ausencia de infección. Por el contrario, los niños que tengan dos resultados de PCR positivos, deben ser considerados infectados y tienen que ser tratados inmediatamente. En el caso de discordancia entre los resultados de PCR obtenidos, se realizaría una tercera PCR.

El algoritmo diagnóstico que proponemos estaría indicado para implantarse principalmente en hospitales de áreas no endémicas urbanas, donde el seguimiento es más exhaustivo y existe una mayor adherencia de los pacientes. Teniendo en cuenta que difícilmente se podría implantar en áreas endémicas, sobre todo rurales, donde los recursos e instalaciones son más limitados; y existe una mayor dificultad para el seguimiento de los recién nacidos.

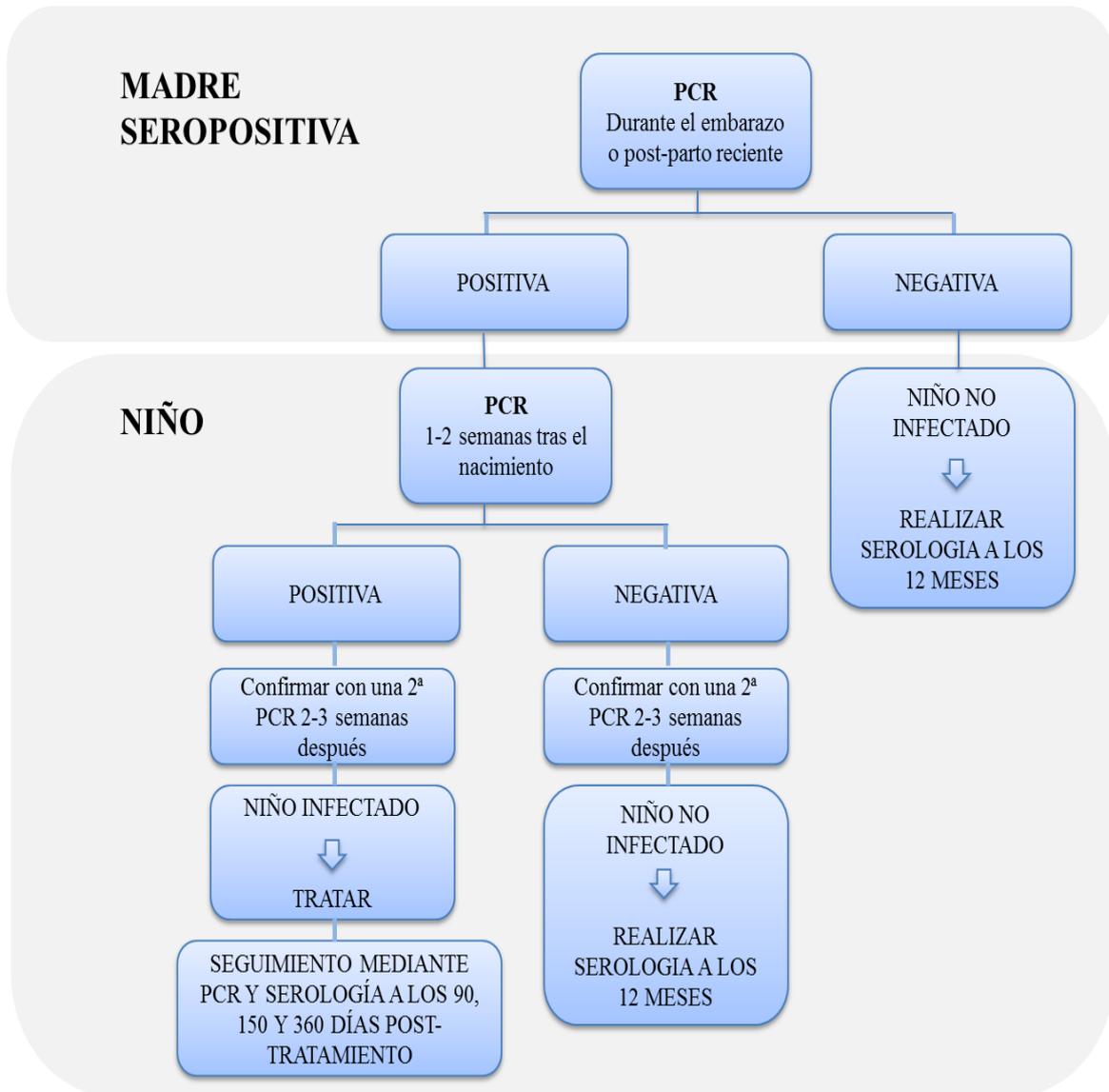


Figura V.1. Algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita

1.2.3 Cuantificación de la carga parasitaria

En los últimos años, se ha analizado la implicación de la carga parasitaria como factor de riesgo implicado en de la transmisión vertical de *T. cruzi*. Hasta ahora, son varios los autores que han corroborado la presencia de cargas parasitarias más elevadas en las madres que transmiten la infección a sus recién nacidos, respecto a aquellas que no la transmiten (Virreira *et al.*, 2007; Bern *et al.*, 2009; Bua *et al.*, 2012; Kaplinski *et al.*, 2015). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo están en concordancia con lo publicado por estos autores. En nuestro estudio, la carga parasitaria media en las madres que transmitieron la infección fue de $1,04 \times 10^5$ ng/uL (IC95%: $1,87 \times 10^5$ - $2,13 \times 10^5$); mientras que en las madres que no transmitieron la infección fue de $3,29 \times 10^6$ ng/uL (IC95%: $1,53 \times 10^6$ - $8,1 \times 10^6$). Nuestros resultados indican existe una relación significativa entre mayores niveles de parásito en sangre y la transmisión vertical de *T. cruzi* ($p = 0,008$). Por tanto podemos concluir que la carga parasitaria es un factor de riesgo implicado en la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, en una madre que transmitió la infección (madre del congénito 10, resultados tabla IV.1), se detectó una carga parasitaria baja, similar a la de las madres que no transmitieron la infección. Esta situación, ha sido previamente descrita por Bua *et al.* (2012) en un estudio en el que la carga parasitaria de una de las madres que transmitió la infección a su recién nacido se encontraba por debajo del límite de detección de la PCR cuantitativa. Existen otros factores, además del incremento de la parasitemia, que están implicados en la transmisión vertical del parásito; como son el sistema inmunológico de la madre y del recién nacido, la cepa de *T. cruzi* o factores placentarios (Cevallos y Hernández, 2014; Schijman, 2006). Por otro lado, también detectamos madres que no transmitieron la infección a sus recién nacidos a pesar de que presentaron cargas parasitarias similares a las madres que sí que transmitieron la infección (madres número 16 y 17, resultados tabla IV.1). Lo cual indica que, aunque la PCR cuantitativa es una herramienta útil para detectar a aquellas madres que presentan mayores cargas parasitarias, no se puede llegar a establecer una carga parasitaria límite a partir de la cual se produce la transmisión. Por lo tanto, actualmente la PCR cuantitativa no aporta más información a la obtenida con la técnica de PCR cualitativa para el manejo de las madres crónicamente infectadas.

Una de las limitaciones de este trabajo es que partimos de DNA purificado y no de parásito para realizar la cuantificación. Nuestros resultados nos permiten comparar las cargas parasitarias expresadas en ng/uL, pero no permiten la comparación con otros trabajos en los cuales la carga parasitaria se expresa en parásitos por mililitro.

2. Tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida de prevención primaria de la transmisión vertical de *T. cruzi*.

Una de las principales limitaciones del tratamiento específico frente a *T. cruzi* disponible en la actualidad, es su elevada toxicidad en el paciente adulto. Produciendo una elevada tasa de efectos secundarios, que en ocasiones conllevan la interrupción del tratamiento (Bern *et al.*, 2007; Carrilero *et al.*, 2011). Esto queda reflejado en nuestro estudio, en el que la frecuencia de aparición de reacciones adversas a beznidazol en las madres tratadas antes del embarazo fue del 41,7%. Las reacciones adversas fueron principalmente de origen dermatológico. Esta elevada tasa de efectos secundarios al beznidazol en pacientes adultos, así como, la mayor frecuencia de reacciones adversas de origen cutáneo, ésta en concordancia con los trabajos descritos previamente (Carrilero *et al.*, 2011). El tratamiento tuvo que ser interrumpido en dos de las mujeres por intolerancia al mismo, la causa en ambas mujeres fue una dermatitis por hipersensibilidad. Ambas mujeres fueron tratadas de nuevo con nifurtimox, completando tratamiento antes de quedarse embarazadas.

Actualmente se están estudiando diferentes estrategias para reducir la toxicidad de estos fármacos en el paciente adulto. Se ha propuesto modificar la posología acortando el tiempo de tratamiento (Alvarez *et al.*, 2012; Bustamante *et al.*, 2014; Viotti *et al.*, 2014); así como, la administración conjunta con fármacos inhibidores del ergoesterol -posaconazol e itraconazol- que han mostrado tener un efecto sinérgico (Cencig *et al.*, 2012; Assíria Fontes Martins *et al.*, 2015). También se están estudiando nuevos compuestos que puedan ser eficaces frente a *T. cruzi*. No obstante, en la actualidad beznidazol y nifurtimox son los únicos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Ambos fármacos han demostrado su efectividad en la fase aguda de la enfermedad, al curar la infección. Mientras que, en la fase crónica de la enfermedad la efectividad del tratamiento no está tan clara; ya que, en esta fase el título

de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi* se mantienen positivo durante años, siendo la tasa de curación menor. Sin embargo, son varios los autores que destacan la eficacia del tratamiento en esta fase de la enfermedad al producir: 1) la eliminación de la parasitemia, produciéndose una cura parasitológica (Murcia *et al.*, 2010, 2016; Molina *et al.*, 2014); 2) disminución gradual del título de anticuerpos, que con el paso de los años llegan a negativizar (Fabbro *et al.*, 2007; Viotti *et al.*, 2011); 3) disminución de la progresión de la enfermedad hacia las formas sintomáticas (cardíaca y digestiva) y disminución de la mortalidad (Fabbro *et al.*, 2000; Viotti *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2009; Villar *et al.*, 2014). Por lo tanto, la recomendación actual incluye ofrecer el tratamiento a todos los adultos entre 19 y 50 años con enfermedad de Chagas crónica, sin cardiopatía avanzada; además de a los pacientes con infección aguda, infección congénita, reactivaciones y niños menores de 18 años (Bern *et al.*, 2007; Sosa-Estani *et al.*, 2012; Roca *et al.*, 2015).

El tratamiento durante el embarazo no está indicado debido a la posibilidad de efectos teratógenos en el feto. El tratamiento tripanocida ha sido administrado a la mujer embarazada en ocasiones especiales, obteniendo buenos resultados, pero los datos son muy escasos; serían necesarios más estudios en este campo para poder evaluar estos hallazgos. De este modo, recientemente se ha descrito el caso de una mujer embarazada con enfermedad de Chagas y coinfectada con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) en la que se produjo una reactivación de una meningoencefalitis por *T. cruzi* durante el embarazo, teniendo que administrarle el tratamiento con beznidazol a las 26 semanas de embarazo por el riesgo que corría su vida. Se observó una buena respuesta al tratamiento y no se produjeron efectos adversos ni en la madre, ni en el recién nacido. Además cabe resaltar, que no se produjo la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi* (Bisio *et al.*, 2013). Otro caso similar ha sido descrito, pero en esta ocasión el tratamiento fue administrado al inicio del embarazo, al desconocerse que la mujer estaba embarazada. No observándose secuelas en el recién nacido y no produciéndose la transmisión vertical de la infección (Corrêa *et al.*, 2014).

El tratamiento tripanocida tiene el papel de eliminar la parasitemia, evitar la progresión de la enfermedad e interrumpir la transmisión de la misma. Con esta premisa surgió la hipótesis de que, puesto que no ésta indicado tratar a la mujer embarazada;

existía la posibilidad de anticiparse y tratar a la mujer en edad fértil como medida para prevenir la transmisión vertical en el momento del embarazo (Sosa-Estani *et al.*, 2009).

En nuestro estudio se monitorizó el tratamiento mediante PCR en los 38 embarazos, de las treinta y seis madres tratadas, (dos de ellas dieron a luz dos veces después de haber recibido el tratamiento) hasta el momento del parto. Siendo en la mayoría de ellas la PCR persistentemente negativa en los controles realizados post-tratamiento, y manteniéndose así hasta el momento del parto. Solo se detectó fracaso terapéutico en un 7,9% (3 madres en las que la parasitemia volvió a ser detectable mediante PCR del total de 38 embarazos) de las madres tratadas. Este porcentaje es similar al descrito en pacientes adultos en fase crónica de la enfermedad de Chagas tratados con benznidazol (Murcia *et al.*, 2010, 2016). Lo que indica que, pese a producirse durante el embarazo un estado de inmunosupresión transitoria, en el que se produce un incremento de la parasitemia, esto no se ve reflejado en una mayor tasa de fracasos terapéuticos. Por el contrario, el porcentaje de resultados de PCR positivos en el momento del embarazo, en las mujeres que no habían recibido tratamiento fue muy superior en comparación al obtenido en las mujeres no embarazadas (67,8% frente al 48% respectivamente).

A pesar de que en tres de las mujeres tratadas, la PCR se volvió positiva durante el embarazo; ninguna de las madres tratadas transmitió la infección a su recién nacido (ningún niño infectado de 38 embarazos de madres tratadas). Mientras que, la tasa de transmisión vertical fue del 13,2% entre las madres no tratadas (16 niños infectados de 121 embarazos de madres no tratadas). Cabe resaltar que los 16 niños infectados nacieron de madres que tuvieron un resultado de PCR positivo durante el embarazo. Estos datos demuestran el papel protector del tratamiento de la mujer en edad fértil como medida de prevención de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas. La eficacia del tratamiento de las mujeres en edad fértil como medida de prevención de la enfermedad de Chagas congénita ha sido descrita previamente por otros autores (Sosa-Estani *et al.*, 2009; Moscatelli *et al.*, 2015) y por nuestro grupo de trabajo (Murcia *et al.*, 2013), pero en estos estudios no se llega a obtener una diferencia estadísticamente significativa por el limitado número de mujeres tratadas. Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral confirman que existe una relación estadísticamente significativa entre el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas congénita ($p = 0.019$). Un reciente estudio retrospectivo, en la que se analizó la transmisión vertical de la

enfermedad de Chagas en 144 mujeres tratadas antes del embarazo, llega a la misma conclusión que la obtenida en nuestro trabajo. No obstante dicho estudio se realizó en zona endémica, donde existe el riesgo de transmisión vectorial, siendo más difícil establecer retrospectivamente el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Fabbro *et al.*, 2014).

El tratamiento en la fase crónica de la enfermedad de Chagas no garantiza la cura de la enfermedad, como queda reflejado en nuestro estudio, ya que en las 36 mujeres tratadas la serología se mantiene con resultados positivos durante el período de seguimiento. Sin embargo, el tratamiento sí que ha demostrado disminuir la parasitemia y con ello, evitar la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas. En el estudio realizado por Fabbro *et al.*, (2014), en el que se realiza un seguimiento a más largo plazo del tratamiento de las mujeres en edad fértil; sí se demuestra la conversión a niveles de anticuerpos indetectables tras 10 años de tratamiento, siendo mayor la tasa de negativización de la serología en aquellas mujeres que fueron tratadas antes de los 15 años de edad. En este estudio, en el 64% de las mujeres tratadas antes de los 15 años negativizó la serología tras 17 años de seguimiento. Estos datos corroboran la importancia de realizar cuanto antes el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ya que se obtiene mejor respuesta terapéutica, siendo además menor el riesgo de que la enfermedad progrese y menor el riesgo de transmisión de la enfermedad.

Cabe resaltar que, dos madres que antes de su primer embarazo no habían sido tratadas, transmitieron la infección a sus recién nacidos. Mientras que, en su segundo embarazo, tras haber recibido tratamiento; ninguna de las dos madres transmitió la infección a sus recién nacidos. Estos hallazgos refuerzan el papel protector del tratamiento en la prevención de la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas.

Nuestros resultados ponen de manifiesto la importancia del tratamiento de la mujer en edad fértil como medida de prevención primaria de enfermedad de Chagas, con la que se conseguiría evitar la aparición de nuevos casos de Chagas congénito. En áreas no endémicas, como es nuestra región, donde ésta es la única vía de transmisión de la enfermedad; adoptando esta medida se podría llegar a interrumpir su transmisión. Lo cual repercutiría directamente en el sistema sanitario, reduciendo los costes sanitarios y sociales que ocasiona esta enfermedad. Todos estos hallazgos conducen a recomendar firmemente el tratamiento en la mujer en edad fértil con enfermedad de Chagas.

3. Estudio de la lactancia materna como posible vía de transmisión de *T. cruzi* al recién nacido.

La lactancia materna ha sido considerada una posible vía de transmisión de *T. cruzi*. En ratones, se ha demostrado la transmisión de *T. cruzi* a través de leche materna contaminada con trypomastigotes, pero la transmisión natural a través de la lactancia materna no ha sido claramente demostrada (Ferreira *et al.*, 2001; Santos-Ferreira *et al.*, 2003). En humanos, se ha llegado a detectar la presencia de este parásito en leche materna, pero no se ha podido confirmar esta vía de transmisión sin descartar otras posibilidades, como: la contaminación con sangre materna por la presencia de fisuras en los pezones (Mazza *et al.*, 1936; Medina-Lopes M, 1983; 1988), o la propia vía de transmisión vertical (Rassi *et al.*, 2004). Los estudios realizados hasta la fecha son escasos y antiguos. En los que se han empleado técnicas como la observación microscópica de la leche, el cultivo del parásito o el microhematocrito; las cuales han demostrado tener una baja sensibilidad, especialmente en la fase crónica de la enfermedad de Chagas.

En nuestro estudio empleamos la técnica de PCR, que ha demostrado ser capaz de detectar cargas parasitarias bajas, para la detección de *T. cruzi* en muestras de leche materna de madres crónicamente infectadas. Detectándose la presencia de *T. cruzi* solamente en una muestra de leche materna, de una madre con parasitemia detectable mediante PCR; pero que no transmitió la infección al recién nacido a pesar de haberle dado la lactancia. Además se descartó la posibilidad de que la leche se hubiese contaminado con sangre materna, al no presentar la madre fisuras en los pezones durante la lactancia.

Debido a que nuestro trabajo es el primero en realizar la PCR frente al ADN de *T. cruzi* en leche materna, las muestras se procesaron de 3 formas diferentes antes de la extracción del ADN (una de las alícuotas conservada a -20°C se extrajo directamente y las otras dos alícuotas, la conservada a -20°C y la que se mezcló con igual volumen de guanidina -HCl 6M/EDTA 0,2M, se sometieron a un proceso de ebullición durante 15 min previa extracción; materiales y métodos apartado 4.1), ya que no existe un protocolo estandarizado. Respecto al procesamiento de las muestras de leche, no es posible concluir cual es el mejor protocolo extracción; dado que solo fue positiva una

muestra de leche y que debido al reducido volumen de muestra disponible, ésta solo pudo ser procesada de dos formas diferentes (muestra de leche materna conservada a -20°C y procesada directamente, y muestra de leche conservada a -20°C y sometida a ebullición previa extracción) siendo positiva únicamente la muestra de leche conservada a -20°C y procesada directamente.

Los resultados obtenidos muestran que no existe correlación entre la parasitemia en sangre materna y la detección del parásito en leche, ya que, mientras que el 66,7% de las madres que no habían recibido tratamiento presentaron un resultado positivo de PCR en sangre, únicamente en una de ellas la PCR en leche fue positiva. Estos resultados son similares a los descritos por Bittencourt *et al.* (1988), que no llegan a detectar la presencia de *T. cruzi* en 78 muestras de leche de madres crónicamente infectadas, a pesar de que 5 de ellas tenían parasitemia detectable. No obstante en dicho trabajo la detección del parásito se realizó mediante xenodiagnóstico, técnica con una sensibilidad menor que la PCR.

Incluso en los estudios realizados en ratones en fase aguda de la enfermedad de Chagas, a pesar de detectarse la presencia del parásito en leche, no se produce en ningún caso la transmisión a través de la lactancia (Disko y Krampitz, 1971; Miles, 1972; Campos *et al.*, 1988; Martins *et al.*, 2011). Una de las hipótesis que explicarían esta situación, es que la transferencia de anticuerpos maternos a través de la leche podría ejercer un papel protector frente a la infección (Miles, 1972; Bittencourt *et al.*, 1988).

En nuestro estudio, no se detectó ningún caso de transmisión a través de la lactancia materna. Los tres recién nacidos infectados, se confirmaron como casos congénitos, dado que el diagnóstico se produjo en el momento del nacimiento (congénitos 4, 6 y 7; resultados tabla IV.3). Además, la PCR para *T. cruzi* en leche materna fue negativa en las tres madres que transmitieron la infección. En los recién nacidos no infectados se realizó un seguimiento durante la lactancia, no resultado ninguno de ellos infectados durante este período de tiempo.

La leche materna parece ser un medio adecuado para *T. cruzi*, puesto que es un medio líquido rico en nutrientes que se mantiene a la temperatura corporal. Sin embargo, el hecho de que detectemos la presencia de *T. cruzi* en una muestra de leche, pero que no se produzca la transmisión a través de la lactancia, podría ser debido a que

probablemente en la leche el parásito se encuentre en la forma de tripomastigote sanguíneo. Esta forma del parásito tiene una menor capacidad que el tripomastigote metacíclico para penetrar en la mucosa gástrica, al no disponer de muchas de las moléculas de superficie implicadas en la invasión tisular (Yoshida, 2006); y por tanto, difícilmente puede causar la infección en el lactante. Además, se ha descrito que el tripomastigote sanguíneo, podría ser destruido por la acción de los jugos gástricos (Cortez *et al.*, 2012).

Actualmente, debido a los beneficios que aporta la lactancia materna al recién nacido, y al no existir evidencia de la transmisión de *T. cruzi* a través de esta vía, no se recomienda su interrupción en las madres con enfermedad de Chagas en fase crónica. Solo en caso de presentar la madre fisuras en los pezones, se debería interrumpir la lactancia. Así como, se debería considerar en los casos de enfermedad de Chagas aguda o en pacientes inmunodeprimidos con una reactivación de la enfermedad, dónde la lactancia puede suponer un riesgo para el recién nacido (Norman y López-Vélez, 2013). Una alternativa en estos casos, para disminuir el riesgo, sin tener que interrumpir la lactancia sería hervir la leche materna (pasteurización o microondas). Estudios realizados en ratones han demostrado que la viabilidad de *T. cruzi* se ve afectada si se somete a este proceso térmico impidiendo de este modo la infección (Ferreira *et al.*, 2001; Santos-Ferreira *et al.*, 2003).

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo, apoyarían la recomendación actual de no interrumpir la lactancia en las madres crónicamente infectadas. Ya que, pese a la utilización de técnicas de diagnóstico más sensibles como la PCR, la detección de *T. cruzi* en muestras de leche de madres crónicamente infectadas solo se produjo en una única muestra; y a pesar de ello, no se produjo la transmisión de la infección al recién nacido. Estos datos, junto con consideraciones comentadas previamente -forma en la que se encuentra el parásito en leche materna, destrucción del parásito por los jugos gástricos y transferencia de anticuerpos maternos- sustentarían que el riesgo de transmisión de la infección por esta vía en las madres crónicamente infectadas, incluso con parasitemia detectable, es muy bajo.

4. Técnicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

Tradicionalmente, el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita se ha basado en el empleo de técnicas parasitológicas convencionales, microhematocrito y cultivo parasitológico, antes de los seis meses de vida; o mediante serología (empleando dos técnicas serológicas con diferente principio antigénico) a partir de los 9-12 meses de vida, momento en el que se produce el aclaramiento de los anticuerpos maternos (Brutus *et al.*, 2010; De Rissio *et al.*, 2010; Carlier *et al.*, 2015). La técnica de PCR en sangre de cordón umbilical y sangre periférica, ha sido considerada en la última década como una herramienta prometedora para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, por la buena sensibilidad alcanzada y la rapidez diagnóstica (Russomando *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003; Virreira *et al.*, 2003; Bern *et al.*, 2009). Dado que el 100% de los niños que son diagnosticados y tratados antes del año de vida se curan (Altcheh *et al.*, 2010; Carlier *et al.*, 2011), una técnica como la PCR que además de proporcionar un diagnóstico fiable, también es rápido; se convierte en una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

Asimismo, también hay que resaltar la necesidad de programas de cribado de mujeres latinoamericanas embarazadas, que nos permitan identificar aquellas madres seropositivas con riesgo de transmitir la infección a sus recién nacidos. Con la finalidad de realizar un seguimiento más exhaustivo del embarazo, que permita el diagnóstico precoz en el recién nacido para poder instaurar lo antes posible el tratamiento.

En nuestro estudio se realizó el seguimiento de 144 mujeres latinoamericanas embarazadas con enfermedad de Chagas que durante el período de estudio dieron a luz 160 recién nacidos, de los cuales 16 fueron diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita. Las técnicas parasitológicas convencionales, microhematocrito y cultivo del parásito, mostraron una buena especificidad pero una baja sensibilidad, 9,1% y 63,6% respectivamente. La baja sensibilidad de estas técnicas convencionales en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, ha sido previamente descrita por otros autores (Russomando *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2005; Bua *et al.*, 2013). En el caso del cultivo de *T. cruzi*, además de la baja sensibilidad, hay que tener en cuenta que resulta una técnica laboriosa de realizar, que requiere de unas instalaciones

específicas y son necesarios al menos 30 días para la obtención del resultado. En cuanto a los resultados obtenidos con la técnica del microhematocrito, cabe destacar que en nuestro estudio únicamente permitió el diagnóstico de uno de los congénitos. La baja sensibilidad que el microhematocrito mostró en nuestro estudio podría deberse a que en los recién nacidos infectados la parasitemia es variable según se ha descrito en algunos estudios (Bua *et al.*, 2012, 2013), siendo más baja en el primer mes de vida y se hace máxima hacia el sexto meses de vida. Esto indica que la sensibilidad de esta técnica se puede ver influenciada por la edad del recién nacido a la que se tome la muestra. No obstante, el único niño que obtuvo un resultado de microhematocrito positivo en nuestro estudio fue diagnosticado con un día de vida. Otro factor que habría que tener en cuenta es que se puede producir la pérdida de la movilidad de los tripomastigotes sanguíneos si se retrasa el procesamiento de la muestra de sangre; dificultando la identificación microscópica.

En contraste con los resultados obtenidos mediante las técnicas parasitológicas convencionales, la técnica de PCR en sangre periférica mostró una excelente sensibilidad (100%) en los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita y especificidad (100%) en los 144 niños no infectados. Permitiendo el diagnóstico precoz en 11 de los niños infectados, de los cuales se dispuso de muestra de sangre periférica en los 6 primeros meses de vida. Además, la PCR también fue positiva en uno de los casos congénitos diagnosticado a los 12 meses de vida y en los 4 casos congénitos diagnosticados con más de un año de vida; mostrando la PCR en nuestro estudio una sensibilidad superior a la descrita en otros trabajos en niños de este mismo rango de edad (Schijman *et al.*, 2003).

Se ha sugerido que la técnica de PCR realizada inmediatamente después del parto podría amplificar fragmentos de ADN del parásito muerto trasferido de la madre al recién nacido (Virreira *et al.*, 2007), aunque cada vez son más los estudios que muestran que un resultado de PCR positivo próximo al momento del nacimiento, se correlaciona con infección y por tanto con la detección de parásito vivo (Bua *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2014). En nuestro estudio, todos los casos de infección congénita fueron confirmados con una segunda muestra de sangre tomada 2-3 semanas después del nacimiento, descartándose la posibilidad de resultados falsos positivos. Además, en 3 de los 4 niños en los que el diagnóstico se realizó entre los 0-20 días de vida (congénitos

número 3, 5, 6 y 7; apartado de resultados, tabla IV.3) con un resultado de PCR positivo, el diagnóstico también se confirmó mediante el aislamiento del parásito en cultivo.

La serología mostró una buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, obteniéndose un resultado serológico positivo en los 6 congénitos con un año o más de vida y resultado serológico negativo en los 144 niños no infectados. No obstante, esta técnica solo tiene valor diagnóstico a partir de los 9-12 meses de vida.

El hecho de que se retrase el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita debido a la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas convencionales o por tener que esperar el resultado de las técnicas serológicas hasta los 12 meses de vida, contribuye a la pérdida del seguimiento de los recién nacidos y al infradiagnóstico de la transmisión vertical de *T. cruzi*. De este modo, ha sido descrito que hasta en el 80% de los niños se pierde el seguimiento a partir de los 6 meses de vida y menos de la mitad de casos de Chagas congénito son correctamente diagnosticados y tratados (Salas *et al.*, 2007; Brutus *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2011). Con este escenario, cobra un especial interés una técnica como la PCR, que permite un diagnóstico fiable y precoz de la enfermedad de Chagas congénita. Cada vez son más los autores que proponen la PCR como técnica de referencia en el diagnóstico de los casos congénitos (Mora *et al.*, 2005; Bua *et al.*, 2013; Velázquez *et al.*, 2014). Algunos autores ya la incluyen como parte del algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, con la consideración de que la técnica ha de realizarse en sangre periférica y obtener dos resultados positivos de PCR para confirmar el diagnóstico (OMS, 2002; Schijman, 2006; Barona-Vilar *et al.*, 2012; González-Tomé *et al.*, 2013; Bern, 2015). Sin embargo, aunque la técnica de PCR ha sido evaluada en un estudio multicéntrico en muestras de pacientes adultos (Schijman *et al.*, 2011), en niños no se ha llevado a cabo su estandarización (Carlier *et al.*, 2011). Por lo tanto, uno de los objetivos prioritarios en un futuro próximo debería ser la realización de un estudio multicéntrico para la estandarización de esta técnica para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

También hay que tener en cuenta que aunque esta técnica ofrece grandes ventajas, no ésta exenta de inconvenientes; ya que, aunque el coste, las instalaciones y el personal para la realización de esta técnica es asumible en la mayoría de laboratorios de áreas no

endémicas; no sucede lo mismo en muchos centros de salud de zonas rurales donde la enfermedad es endémica, zonas que disponen de menos recursos e infraestructuras sanitarias.

Recientemente se han descrito técnicas basadas en la detección de anticuerpos específicos frente a proteínas semipurificadas como el antígeno hierro Superóxido Dismutasa (FeSODe) (Concha Valdez *et al.*, 2016) o recombinantes como el antígeno de fase aguda (SAPA) (Volta *et al.*, 2015) del parásito para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita. El sistema de ELISA frente al antígeno recombinante SAPA fue desarrollado por la Universidad de la Asunción, Paraguay en 1998, y actualmente se emplea por el Sistema de Salud Público de Paraguay para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Mallimaci *et al.*, 2010; Russomando *et al.*, 2010). No obstante, aunque en el caso de la detección del antígeno de fase aguda (SAPA) se tiene una mayor experiencia, estas técnicas se encuentran actualmente en estudio. Según los estudios realizados la sensibilidad alcanzada por ambas es aceptable, pero solo se consideran una alternativa a la técnica de PCR en áreas donde no es posible disponer de un laboratorio que permita la realización de técnicas de biología molecular, dado que éstas presentan mayor sensibilidad y rapidez diagnóstica que las técnicas serológicas descritas.

En definitiva, nuestros resultados refuerzan la utilidad de la técnica de PCR como una herramienta fundamental en el diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi*. En base a los resultados obtenidos con esta técnica en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, así como, en el cribado mediante PCR en las madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas; proponemos un cambio en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, en el que la técnica de PCR cobre un papel más relevante (figura V.1).

Muestras empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita mediante PCR. Comparación con los resultados de PCR obtenidos en sangre periférica.

La muestra de sangre de cordón umbilical ha sido empleada en diversos estudios para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita (Virreira *et al.*, 2003; Mora *et al.*, 2005; Bern *et al.*, 2009; Qvarnstrom *et al.*, 2012), por ser una muestra no invasiva y

por la capacidad de disponer de un mayor volumen de sangre del recién nacido en el momento del nacimiento. En nuestro estudio, la sensibilidad de la técnica de PCR en sangre de cordón umbilical fue baja. Ya que se obtuvo una sensibilidad del 50%, permitiendo únicamente el diagnóstico de uno de los dos congénitos de los cuales se dispuso de muestra de sangre de cordón en el momento del nacimiento. Estos resultados están en concordancia con lo descrito por otros autores, que observan una menor sensibilidad de la técnica de microhematocrito (Mora *et al.*, 2005), y de PCR (Bern *et al.*, 2009) cuando se emplea la muestra de sangre de cordón para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, en comparación con la muestra de sangre periférica. En cuanto a la especificidad de la PCR en sangre de cordón fue del 97,7%, también menor que la alcanzada en sangre periférica; ya que, en uno de los recién nacidos no infectados la PCR en sangre de cordón fue positiva (las muestras de sangre periférica obtenidas a los 15 días y al mes fueron PCR negativas y la serología negativizó a los 12 meses, considerándose no infectado). Este resultado falso positivo podría deberse a la posible contaminación de la sangre de cordón con sangre materna, como ha sido descrito en la literatura (Flores-Chávez *et al.*, 2007)

La menor sensibilidad de la PCR en muestras de sangre de cordón umbilical y la posibilidad de obtener falsos positivos por la contaminación con sangre materna, hacen necesaria la confirmación del resultado obtenido realizando una segunda PCR en muestras de sangre periférica del recién nacido. Por ello, consideramos que la sangre de cordón umbilical no es la muestra más adecuada para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

Las muestras de tejido de placenta y cordón umbilical también han sido empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, aunque los estudios que han utilizado este tipo de muestra son escasos. En nuestro trabajo se realizó la PCR en tejido de cordón umbilical y placenta en 33 madres, de las cuales una transmitió la infección a su recién nacido. Los resultados de PCR en ambos tipos de tejido fueron positivos en el niño infectado. Por tanto, la PCR en muestras de tejido de placenta y cordón umbilical presentó una buena sensibilidad para el diagnóstico de la infección congénita; superior a la detectada en otro estudio en el que al igual que en el nuestro, se dispuso únicamente de una muestra de placenta de una madre que transmitió la infección a su recién nacido, resultando en su caso la PCR en tejido de placenta negativa (Bisio *et al.*, 2011). La

sensibilidad de la PCR en muestras de tejido de cordón y placenta en nuestro trabajo también fue superior a la descrita previamente por Bern *et al.* (2009), en el que también se realizó la PCR en tejido de placenta y cordón umbilical para detectar la presencia de *T. cruzi*, obteniendo una sensibilidad del 77% en tejido de placenta y del 87,5% en tejido de cordón umbilical.

En cuanto a la especificidad de la PCR en muestras tejido de cordón umbilical, en nuestro estudio fue del 96,9%, más baja que la detectada por el grupo de Bern *et al.* (2009); en el que todos los niños no infectados obtuvieron un resultado de PCR en tejido de cordón umbilical negativo. La especificidad de la PCR en tejido de placenta fue aún menor (93,8%), puesto que dos madres que no transmitieron la infección a sus hijos presentaron un resultado de PCR positivo en tejido de placenta. Nuestros resultados están en concordancia con lo descrito por otros autores, que describen la baja especificidad de la muestra de tejido placentario para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita, considerándola una muestra inadecuada (Bittencourt, 1976; Azogue y Darras, 1991; Bern *et al.*, 2009; Bisio *et al.*, 2011). La presencia de *T. cruzi* en la placenta de las madres que no transmiten la infección, e incluso en madres con resultado de PCR negativo en sangre periférica, podría sugerir la existencia de cepas con especial tropismo placentario (Bisio *et al.*, 2011). El hecho de que no se produzca la transmisión de la infección al recién nacido, a pesar de la invasión placentaria del parásito, pone de manifiesto la eficacia de las células trofoblásticas de la placenta, que actúan como una barrera para impedir la transmisión trasplacentaria de *T. cruzi* (Delgado y Santos-Buch, 1978; Andrade, 1982; Mjihdi *et al.*, 2002; Fernández-Aguilar *et al.*, 2005).

La comparación de los resultados de PCR obtenidos en muestras de sangre de cordón umbilical así como en tejido placentario y de cordón umbilical frente a los de sangre periférica (con una especificidad y sensibilidad del 100%), nos permiten concluir que la PCR en muestras de sangre periférica parece ser la estrategia más adecuada en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

5. Manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita.

La infección por *T. cruzi* puede afectar al curso del embarazo apareciendo complicaciones como la aparición de abortos espontáneos (Castilho y Silva, 1976; Schenone *et al.*, 1985). En estudios experimentales con animales se ha descrito que *T. cruzi* afecta a la reproducción en ratones, induciendo pérdidas fetales asociadas con la invasión parasitaria y la necrosis isquémica de la placenta (Mjihdi *et al.*, 2002; Pérez-Aguilar *et al.*, 2012). Son varios los trabajos que se han realizado para poder esclarecer si la enfermedad de Chagas ésta asociada a un mayor riesgo de sufrir abortos espontáneos (Schenone *et al.*, 1985; Mjihdi *et al.*, 2002; Sánchez-Negrette *et al.*, 2005). En nuestro estudio, la población analizada estaba compuesta por mujeres latinoamericanas en edad fértil que procedían principalmente de Ecuador y Bolivia, aunque la mayoría de mujeres infectadas eran de origen Boliviano (98,6%), país con mayor prevalencia de enfermedad de Chagas (Basile *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2014). La tasa de abortos espontáneos detectada entre las mujeres con enfermedad de Chagas (36,7%), fue ligeramente superior a la detectada entre las mujeres no infectadas (35,3%); sin embargo, no detectamos diferencias estadísticamente significativas entre presentar la enfermedad de Chagas y tener un mayor riesgo de sufrir abortos espontáneos ($p = 0,719$; χ^2). Estos resultados están en concordancia con lo descrito por otros autores; concluyendo que si no se produce la transmisión de la infección al recién nacido, no se verá afectado el curso del embarazo, ni la salud del recién nacido (Oliveira *et al.*, 1966; Bittencourt, 1992; Avila Arzanegui *et al.*, 2013).

En los casos en los que sí que se produce la transmisión vertical de la infección por *T. cruzi* al recién nacido, se han descrito una serie de complicaciones que pueden producirse en el momento del nacimiento, como son: un mayor número de cesáreas y embarazos pretérmino, bajo peso al nacer y bajo índice de APGAR. En nuestro estudio, de los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita, el 43,7% nacieron mediante cesárea (7 cesáreas de 16 partos), 18,8% fueron prematuros (3 congénitos prematuros de 16 partos), 18,8% presentaron bajo peso al nacer (3 congénitos con bajo peso al nacer de 16 partos), y uno de los congénitos presento bajo índice de APGAR (6.25%). Cabe destacar, que los tres congénitos que presentaron bajo peso al nacer, dos de los congénitos prematuros y el congénito que presento bajo índice de APGAR,

cursaron con manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas tras el nacimiento. En un reciente estudio realizado por Kaplinski *et al.* (2015) se analizó el riesgo de sufrir infección congénita en función del tipo de parto, el porcentaje de cesáreas en las madres que transmitieron la infección fue 61,3%, ligeramente superior al detectado en nuestro estudio. Sin embargo, dicho estudio concluye que no existe una relación estadísticamente significativa entre el nacimiento mediante cesárea y un mayor riesgo de enfermedad de Chagas congénita. No obstante, la prematuridad y el bajo peso al nacer sí que han sido descritos como factores de riesgo independientes de la infección congénita por *T. cruzi* (Bittencourt, 1992; Sánchez-Negrett *et al.*, 2005).

En nuestro estudio, el 18,8% de los niños infectados presentaron manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita (3 congénitos sintomáticos de 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas). Estos resultados son similares a los descritos por otros autores, en los que aproximadamente el 20% de los niños infectados muestran manifestaciones clínicas de la enfermedad; mientras que la gran mayoría son asintomáticos (Torriceo *et al.*, 2004; Bern *et al.*, 2009; Muñoz *et al.*, 2009). Dos de los tres niños que cursaron con manifestaciones clínicas de la enfermedad eran hermanos gemelos (congénito número 8 y 9, apartado de resultados tabla IV.7) y el tercer congénito curso con bajo índice de APGAR al nacer (congénito número 3, apartado de resultados tabla IV.7). Las principales manifestaciones clínicas que presentaron fueron: bajo peso al nacer, prematuridad, hepatoesplenomegalia, distrés respiratorio, anemia e ictericia. También se dio un caso de miocarditis y de fallo cardíaco. Estos hallazgos son similares a los descritos previamente por otros autores (Freilij y Altcheh, 1995; Nisida *et al.*, 1999; Torriceo *et al.*, 2004; Salas *et al.*, 2007; Oliveira *et al.*, 2010).

Recientes estudios han demostrado que existe una relación entre la capacidad de respuesta del sistema inmune innato del recién nacido y las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita. En este sentido, se estudió la respuesta inmune innata de los dos hermanos gemelos (congénito número 8 y 9, apartado de resultados tabla IV.7) que cursaron con manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas congénita (Fernández-Villegas *et al.*, 2014). Se observó que el congénito 8, que curso con una sintomatología más grave, presentó una producción de TNF- α y IL-1 β menor que su hermano gemelo (que curso con una sintomatología más leve) y un grupo

control de 10 niños no infectados; lo cual sugiere un déficit del sistema inmune innato en el congénito que cursa con una sintomatología más grave de la enfermedad.

En nuestra serie no detectamos ningún caso mortal de enfermedad de Chagas congénita. Cabe resaltar que todos los niños fueron tratados tras el diagnóstico y que en el caso de los 3 niños sintomáticos, el diagnóstico y tratamiento se realizó antes de los 6 meses de vida permitiendo probablemente la recuperación precoz de los niños. En estudios antiguos, realizados en Argentina, Brasil y Chile se han descrito tasas de mortalidad y morbilidad muy elevadas de enfermedad de Chagas congénita (Howard y Rubio, 1968; Bittencourt, 1976), posiblemente asociada a la mayor pobreza y menores recursos de la época. En estudios más recientes, tanto en países endémicos como no endémicos, la mortalidad descrita es mucho menor; se estima entorno al 5%, asociada principalmente a casos de meningoencefalitis y miocarditis (Garcia-Bournissen *et al.*, 2009).

6. Tratamiento de los niños con enfermedad de Chagas congénita: seguimiento serológico y por PCR post-tratamiento.

Los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita, once de ellos en su primer año de vida y cinco entre los 4-7 años de edad, mostraron una buena tolerancia al tratamiento con beznidazol (10 mg/kg de peso corporal/día en tres tomas diarias durante 60 días). El mejor perfil de seguridad de beznidazol y nifurtimox en los niños, respecto al paciente adolescente y adulto ha sido descrito en diversos estudios (De Andrade *et al.*, 1996; Sosa Estani *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003; Fumadó *et al.*, 2014). La explicación a este fenómeno es de carácter farmacocinético, un reciente estudio demuestra que el beznidazol es metabolizado más rápidamente en los niños de menor edad, en comparación con el paciente adulto. La menor concentración sérica del fármaco estaría relacionada con la menor aparición de efectos adversos en los niños (Altcheh *et al.*, 2014). La tasa de efectos secundarios en pacientes pediátricos es muy baja, la mayoría de reacciones adversas descritas son de intensidad moderada, siendo excepcionales la aparición de reacciones adversas graves. Los efectos adversos más frecuentemente descritos son, principalmente, dermatológicos (rash, eczema, prurito y urticaria) y digestivos (anorexia, vómitos y dolor abdominal). También se han descrito

alteraciones hematológicas y/o neurológicas y, más excepcionalmente, depresión de la médula ósea y síndrome de Stevens-Johnson. Hay que destacar que el 70% de las reacciones adversas que se describen en los niños en edad pediátrica, se producen en niños mayores de 7 años de edad (Altcheh *et al.*, 2010).

Tras el tratamiento, se realizó un seguimiento serológico y molecular en 13 de los 16 niños diagnosticados de enfermedad de Chagas congénita, ya que, en uno de los niños se perdió el seguimiento tras iniciar tratamiento al regresar a su país de origen (congénito número 2, resultados tabla IV.8) y los otros dos (congénito número 15 y 16, resultados tabla IV.8) continúan en seguimiento, y aún no se dispone de datos de los controles. Los controles post-tratamiento se realizaron a los 60-90 días, 150 días y anualmente hasta la negativización de la serología. Se consideró como criterio de curación la conversión a niveles de anticuerpos indetectables mediante dos técnicas serológicas con diferente principio antigénico (Cancado, 1999; OMS, 2002).

De los 13 niños en los que se realizó el seguimiento del tratamiento, diez de ellos fueron diagnosticados y tratados antes del año de vida (congénito de número 1 al número 11, resultados tabla IV.8), frente a tres que fueron diagnosticados y tratados entre los 4-7 años de edad (congénito número 12, 13 y 14, resultados tabla IV.8). En los 11 niños diagnosticados y tratados con menos de un año de vida la serología negativizó, considerándose curada la infección. Mientras que, en los tres niños diagnosticados con más de un año de vida la serología se mantiene positiva tras 2-4 años después del tratamiento, por lo que no podemos confirmar si se ha curado la infección. Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas congénita, ya que, prácticamente el 100% de los niños que son diagnosticados y tratados antes del año de vida se curan (Freilij y Altcheh, 1995; Blanco *et al.*, 1999; Altcheh *et al.*, 2010; Carlier *et al.*, 2011). En cambio, si el tratamiento se retrasa la enfermedad progresa hacia una fase crónica indeterminada, en la cual la efectividad del tratamiento es menor. Mediante dos ensayos clínicos se ha demostrado que la tasa de curación tras el tratamiento con beznidazol en niños en fase crónica indeterminada de la enfermedad de Chagas disminuye hasta el 60% (De Andrade *et al.*, 1996; Sosa-Estani *et al.*, 1998). Así como, estudios posteriores han demostrado que cuanto antes se instaure el tratamiento en los niños infectados, mayor es la tasa de negativización de la serología frente a *T. cruzi*, y por lo tanto, mayor es la tasa de

curación de la enfermedad (Andrade *et al.*, 2004; Streiger *et al.*, 2004). Estos datos refuerzan la importancia de incorporar técnicas que permitan un diagnóstico precoz y fiable de la enfermedad de Chagas congénita, como es la técnica de PCR.

La curación de la infección en los 11 niños diagnosticados antes del año de vida se ha demostrado, no solo mediante la negativización serológica; sino también parasitológica, al negativizar la PCR en los controles post-tratamiento. En la mayoría de estos niños los resultados de PCR fueron negativos antes que los de la serología, o al mismo tiempo que ésta; lo cual refleja la efectividad del tratamiento en la eliminación del parásito. Estos resultados están en concordancia con lo descrito previamente por otros autores (Russomando *et al.*, 1998; Schijman *et al.*, 2003) y por nuestro grupo de estudio (Murcia *et al.*, 2013).

En los pacientes que entran en una fase indeterminada de la enfermedad de Chagas, evaluar a corto plazo la eficacia del tratamiento es difícil, ya que, en estos pacientes la serología convencional se mantiene positiva durante años tras el tratamiento. Esto es lo que sucede en nuestro estudio con los tres niños diagnosticados y tratados entre los 4 y los 7 años de edad, en los que la serología se mantiene positiva tras 2-4 años de tratamiento. Aunque en dos de estos niños la PCR en los controles post-tratamiento es persistentemente negativa, lo que indica que no hay parasitemia detectable, pero no se puede garantizar la curación de la enfermedad.

Hay autores que han propuesto que la caída del título de anticuerpos específicos frente a *T. cruzi*, podría ser un indicador de buena respuesta al tratamiento (Cancado, 1999; Sánchez-Negrette *et al.*, 2005; Fabbro *et al.*, 2007; Viotti *et al.*, 2011). Actualmente no se dispone de ningún biomarcador que nos permita evaluar la eficacia a corto plazo del tratamiento en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas. Siendo la PCR, la única herramienta que permite monitorizar la eficacia del tratamiento. Un reciente estudio demuestra que la PCR, además de ser una herramienta que permite monitorizar el tratamiento, también permite evaluar la eficacia del mismo. Demostrando que un resultado persistentemente negativo de la PCR en los controles post-tratamiento, se correlaciona con la caída del título de anticuerpos frente a *T. cruzi*; lo cual indica eliminación del parásito (Murcia *et al.*, 2016).

La técnica de PCR ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para monitorizar la eficacia del tratamiento, al detectar rápidamente los casos refractarios al mismo o reactivaciones de la enfermedad. Esto ha sido demostrado en estudios realizados tanto en niños (Solari *et al.*, 2001; Schijman *et al.*, 2003), como en adultos (Murcia *et al.*, 2010). Y queda reflejado en nuestro estudio, donde la técnica de PCR permitió la detección de dos casos de fracaso terapéutico; al positivizar en uno de los controles post-tratamiento en dos de los congénitos (congénito número 9 y congénito número 12, resultados tabla IV.8) a los que no se les había administrado el tratamiento correctamente. En el congénito número 9 (diagnosticado con 6 meses), la PCR y la serología volvieron a ser negativas tras haber administrado el tratamiento correctamente, considerándose curado de la infección. Por el contrario, en el congénito número 12 (diagnosticado con 4 años) la recidiva se detectó mediante PCR positiva en el control de los 3 años post-tratamiento. Tras la segunda administración del tratamiento la PCR negativizó, pero la serología se mantiene positiva; por lo que no podemos confirmar si el paciente se ha curado de la infección. Estos resultados refuerzan la importancia del diagnóstico precoz y el seguimiento de los niños con enfermedad de Chagas. Ya que, incluso en el caso de una mala administración del tratamiento o resistencia al mismo; la detección precoz del fracaso terapéutico y la administración de nuevo del tratamiento permite curar la enfermedad. En cambio, si se retrasa el diagnóstico y el niño entra en la fase indeterminada de la enfermedad, se comporta como un paciente crónico. Por lo que aunque se administre de nuevo el tratamiento, no se garantiza la curación del paciente.

Por lo tanto, la instauración precoz de tratamiento anti-parasitario específico frente a *T. cruzi* ha demostrado: reducir la severidad de los síntomas, disminuir el curso clínico de la enfermedad y reducir la parasitemia. Así como, también permite evitar las graves secuelas tardías de la enfermedad, previniéndose la aparición de los casos crónicos cardíacos y/o digestivos, que se dan en la edad adulta.

Los dos fármacos comercializados actualmente para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, beznidazol y nifurtimox, han demostrado su elevada eficacia (eliminación de la parasitemia) y buen perfil de seguridad (fundamentalmente en niños menores de 7 años) en el tratamiento de la enfermedad de Chagas congénita. Todo niño diagnosticado de enfermedad de Chagas debe de ser inmediatamente tratado. Actualmente, el único

inconveniente es que no existe una formulación pediátrica (solución) de ninguno de los dos fármacos, por lo que la administración del fármaco requiere fraccionar las tabletas de adultos. En nuestro país el tratamiento de primera línea es beznidazol, reservándose nifurtimox en los casos de fracaso terapéutico. Ambos se tienen que solicitar a través de medicación extranjera (González-Tomé *et al.*, 2013).

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. Nuestro estudio pone de manifiesto la necesidad del cribado de la enfermedad de Chagas en las madres y niños que provengan de áreas endémicas. La tasa de transmisión vertical detectada fue del 10%, siendo la mayoría de los niños con enfermedad de Chagas congénita asintomáticos.
2. La detección de parasitemia mediante PCR durante el embarazo, es un factor de riesgo de la transmisión vertical. Asimismo, la PCR presenta un valor predictivo negativo del 100%, lo que permite descartar la transmisión vertical en aquellas madres con un resultado de PCR negativo.
3. Las madres que transmiten la infección a sus recién nacidos tienen cargas parasitarias más elevadas, respecto a aquellas que no la transmiten. Estando la carga parasitaria materna directamente relacionada con el riesgo de infección neonatal.
4. El riesgo de transmisión vertical es mayor entre las madres latinoamericanas con enfermedad de Chagas de edades más jóvenes y con estancias más cortas en nuestro país. Así como, se ha demostrado que el propio embarazo, es un estado fisiológico en el que se produce un incremento de la parasitemia detectado mediante PCR, y con ello un mayor riesgo de transmisión vertical de la infección.
5. El tratamiento de la mujer en edad fértil es una medida eficaz para prevenir la transmisión vertical de la enfermedad de Chagas al reducir la parasitemia. Este hallazgo conduce a recomendar firmemente el tratamiento de la mujer en edad fértil con enfermedad de Chagas.
6. El riesgo de transmisión de *T. cruzi* a través de la lactancia materna en las madres crónicamente infectadas, incluso con parasitemia detectable mediante PCR, es muy bajo. La lactancia es una vía muy improbable de transmisión, y por lo tanto no se debe recomendar la interrupción de la lactancia en las madres crónicamente infectadas.

7. La técnica de PCR en sangre periférica ha demostrado tener una excelente sensibilidad y especificidad, permitiendo realizar un diagnóstico precoz de la enfermedad de Chagas congénita.

8. En el seguimiento post-tratamiento de los niños infectados la técnica de PCR ha demostrado ser una herramienta de gran utilidad para monitorizar la eficacia del tratamiento, al detectar rápidamente los casos refractarios al mismo. Los niños que son diagnosticados y tratados en su primer año de vida se curan. En cambio, si el tratamiento se retrasa la enfermedad progresa hacia una fase crónica indeterminada, en la cual la efectividad del tratamiento es menor.

9. La PCR es una herramienta fundamental para el cribado de las madres con riesgo de transmitir la infección a sus recién nacidos y para el diagnóstico precoz y fiable de los recién nacidos infectados; poniéndose de manifiesto la utilidad de incorporar esta técnica como un elemento fundamental en el algoritmo diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénita.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Abad-Franch, F., Diotaiuti, L., Gurgel-Gonçalves, R. y Gürtler, R. E. (2013) ‘Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: cui bono?’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(2), pp. 251–254.

Alarcón de Noya, B., Díaz-Bello, Z., Colmenares, C., Ruíz-Guevara, R., Mauriello, L., Zavala-Jaspe, R., Suarez, J.A., Abate, T., Naranjo, L., Paiva, M., Rivas, L., Castro, J., Márques, J., Mendoza, I., Acquatella, H., Torres, J., y Noya, O. (2010) ‘Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela’, *The Journal of Infectious Diseases*, 201(9), pp. 1308-1315.

Albajar-Vinas, P. y Jannin, J. (2011) ‘The hidden Chagas disease burden in Europe’, *Eurosurveillance*, 16(38).

Altcheh, J., Moscatelli, G., Mastrantonio, G., Moroni, S., Giglio, N., Marson, M. E., Ballering, G., Bisio, M., Koren, G. y García-Bournissen, F. (2014) ‘Population pharmacokinetic study of benznidazole in pediatric Chagas disease suggests efficacy despite lower plasma concentrations than in adults’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(5), p. e2907.

Altcheh, J., Moscatelli, G., Moroni, S., García-Bournissen, F. y Freilij, H. (2010) ‘Adverse events after the use of benznidazole in infants and children with Chagas disease’, *Pediatrics*, 127(1), pp. e212-218.

Álvarez, M. G., Hernández, Y., Bertocchi, G., Fernández, M., Lococo, B., Ramírez, J. C., Cura, C., Lopez Albizu, C., Schijman, A., Abril, M., Sosa-Estani, S. y 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’, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(2), pp. 833–837.

Álvarez, M. G., Vigliano, C., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G. y Viotti, R. (2012) ‘Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(10), pp. 636–638.

Andrade, A. L., Martelli, C. M., Oliveira, R. M., Silva, S. A., Aires, A. I., Soussumi, L. M., Covas, D. T., Silva, L. S., Andrade, J. G., Travassos, L. R. y Almeida, I. C. (2004)

‘Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi*-infected adolescents after a six-year follow-up’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5), pp. 594–597.

Andrade, S. G. (1982) ‘The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(1), pp. 123–128.

Assíria Fontes Martins, T., de Figueiredo Diniz, L., Mazzeti, A. L., da Silva do Nascimento, Á. F., Caldas, S., Caldas, I. S., de Andrade, I. M., Ribeiro, I. y Bahia, M. T. (2015) ‘Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease’, *PloS One*, 10(6), p. e0128707.

Avila Arzanegui, O., Liendo Arenaza, P., Martinez Indart, L., Martinez Astorkiza, T., Pocheville Guruceta, M. I. y Egurbide Arberas, M. V. (2013) ‘Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y transmisión vertical en mujeres gestantes latinoamericanas en un área de salud de Vizcaya’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(4), pp. 210–216.

Azogue, E. y Darras, C. (1991) ‘Estúdio prospectivo de la enfermedad de chagas en recién nacidos con infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia)’, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24(2), pp. 105–109.

Barcán, L., Luna, C., Clara, L., Sinagra, A., Valledor, A., De Rissio, A.M., Gadano, A., García, M.M., de Santibañes, E., y Riarte, A. (2005) ‘Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas`disease’, *Liver transplantation*, 11, pp. 1112-1116.

Barona-Vilar, C., Giménez-Martí, M. J., Fraile, T., González-Steinbauer, C., Parada, C., Gil-Brusola, A., Bravo, D., Gómez, M. D., Navarro, D., Perez-Tamarit, A., Fernandez-Silveira, L., Fullana-Montoro, A. y Borrás, R. (2012) ‘Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Latin American women and congenital transmission rate in a non-endemic area: the experience of the Valencian Health Programme (Spain)’, *Epidemiology and Infection*, 140(10), pp. 1896–1903.

Basile, L., Jansá, J. M., Carlier, Y., Salamanca, D. D., Angheben, A., Bartoloni, A., Seixas, J., Van Gool, T., Cañavate, C., Flores-Chávez, M., Jackson, Y., Chiodini, P. L., Albajar-Vinas, P. y Working Group on Chagas Disease (2011) 'Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system', *Eurosurveillance*, 16(37).

Bern, C. (2015) 'Chagas' Disease', *The New England Journal of Medicine*, 373(19), pp. 1881-1882.

Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R. H., Lafuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., Pacori, J., Del Carmen Abastoflor, M., Aparicio, H., Brady, M. F., Ferrufino, L., Angulo, N., Marcus, S., Sterling, C. y Maguire, J. H. (2009) 'Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia', *Clinical Infectious Diseases*, 49(11), pp. 1667-1674

Bern, C., Montgomery, S. P., Herwaldt, B. L., Rassi, A. Jr., 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. y Moore, A. C. (2007) 'Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review', *JAMA: the Journal of the American Medical Association*, 298(18), pp. 2171–2181.

Bisio, M., Altcheh, J., Lattner, J., Moscatelli, G., Fink, V., Burgos, J. M., Bournissen, F. G., Schijman, A. G. y Freilij, H. (2013) 'Benznidazole treatment of chagasic encephalitis in pregnant woman with AIDS', *Emerging Infectious Diseases*, 19(9), pp. 1490–1492.

Bisio, M., Seidenstein, M. E., Burgos, J. M., Ballering, G., Risso, M., Pontoriero, R., Moreau, M., Altcheh, J., Leguizamón, M. S., Freilij, H., Marceillac, M. y Schijman, A. G. (2011) 'Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 105(10), pp. 543–549.

Bittencourt, A. L. (1992) 'Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease.', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 34(5), pp. 403–408.

Bittencourt, A. L., Sadigursky, M., Da Silva, A. A., Menezes, C. A., Marianetti, M. M., Guerra, S. C. y Sherlock, I. (1988) 'Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83(1), pp. 37–39.

Bittencourt, A. L. (1976) 'Congenital Chagas disease', *American Journal of Diseases of Children*, 130(1), pp. 97–103.

Blanco, S. B., Segura, E. L. y Gürtler, R. E. (1999) '[Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina]', *Medicina*, 59 Suppl 2, pp. 138–142.

Bosseno, M.F., Yacsik, N., Vargas, F., y Brenière, S.F. (2000) 'Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clones 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, pp. 601-607.

Braun, M. y de Titto, E. (1985) '[Immune response to *Trypanosoma cruzi*. An approach to the pathogenesis of Chagas' disease]', *Acta Physiologica Et Pharmacologica Latinoamericana*, 35(1), pp. 1–47.

Brener, Z. (1973) 'Biology of *Trypanosoma cruzi*', *Annual Review of Microbiology*, 27, pp. 347–382.

Britto, C., Cardoso, M. A., Wincker, P. y 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', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88(1), pp. 171–172.

Brutus, L., Castillo, H., Bernal, C., Salas, N. A., Schneider, D., Santalla, J.A. y Chippaux, J.P. (2010) 'Detectable *Trypanosoma cruzi* Parasitemia during Pregnancy and Delivery as a Risk Factor for Congenital Chagas Disease', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 83(5), pp. 1044–1047.

Bua, J., Volta, B. J., Perrone, A. E., Scollo, K., Velázquez, E. B., Ruiz, A. M., De Rissio, A. M. y 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 Neglected Tropical Diseases*, 7(10), p. e2476.

Bua, J., Volta, B. J., Velazquez, E. B., Ruiz, A. M., Rissio, A. M. y Cardoni, R. L. (2012) ‘Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification’, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 106(10), pp. 623–628.

Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M., Seidenstein, M. E., Piccinali, R., Freitas, J. M., Levin, M. J., Macchi, L., Macedo, A. M., Freilij, H. y Schijman, A. G. (2007) ‘Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease’, *International Journal for Parasitology*, 37(12), pp. 1319–1327.

Burleigh, B. A. y Andrews, N. W. (1995) ‘The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells’, *Annual Review of Microbiology*, 49, pp. 175–200.

Bustamante, J. M., Craft, J. M., Crowe, B. D., Ketchie, S. A. y Tarleton, R. L. (2014) ‘New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice’, *The Journal of Infectious Diseases*, 209(1), pp. 150–162.

Campos, R., Pinto, P. L., Moreira, A. A., Amato Neto, V., Duarte, M. I., de Sant’Ana, E. J. y Tiago, G. G. (1988) ‘[Experimental study on the transmission of Chagas’ disease by milk]’, *Revista do Hospital das Clinicas: Faculdade de Medicina da Universidade de Sao Paulo*, 43(3), pp. 146–147.

Cancado, J. R. (1999) ‘Criteria of Chagas disease cure’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1, pp. 331–335.

Carlier, Y., Sosa-Estani, S., Luquetti, A. O. y Buekens, P. (2015) ‘Congenital Chagas disease: an update’, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), pp. 363–368.

Carlier, Y. y Truyens, C. (2015) ‘Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses’, *Acta Tropica*, 151, pp. 103–115.

Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H. y Albajar Vinas, P. (2011) 'Congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10), p. e1250.

Carlier, Y. y Truyens, C. (2010) 'Maternal-Fetal Transmission of *Trypanosoma cruzi*, one hundred years of research.'. En: Telleria J, Tibayrenc M, Eds. American Trypanosomiasis: Chagas Disease One hundred Years of Research. Burlington: Elsevier. pp. 539–581.

Carrilero, B., Murcia, L., Martínez-Lage, L. y Segovia, M. (2011) 'Side effects of benznidazole treatment in a cohort of patients with Chagas disease in non-endemic country', *Revista Española de Quimioterapia*, 24(3), pp. 123–126.

Castilho, E. A. y Silva, G. R. (1976) 'Maternal Chagas' infection and prematurity.', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 18(4), pp. 258–60.

Castro, C., Hernandez, E. B., Rezende, J. y Prata, A. (2010) '[Radiological study on megacolon cases in an endemic area for Chagas disease]', *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical*, 43(5), pp. 562–566.

Cencig, S., Coltel, N., Truyens, C. y Carlier, Y. (2012) 'Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 40(6), pp. 527–532.

Cevallos, A. M. y Hernández, R. (2014) 'Chagas' Disease: Pregnancy and Congenital Transmission', *BioMed Research International*, 2014, pp. 1–10.

Chagas, C. (1911) '[Nova entidade morbida do homen. Resumo geral de estudos etiologicos e clinicos]', 3, pp. 219–275.

Chagas, C. (1909) 'Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung.', 13, pp. 120–122.

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. y 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*, 46(10), pp. 1737–1744.

Cheng, K. Y., Chang, C. D., Salbilla, V. A., Kirchhoff, L. V., Leiby, D. A., Schochetman, G. y Shah, D. O. (2007) 'Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*', *Clinical and vaccine immunology*, 14(4), pp. 355–361.

Concha Valdez, F., Marín, C., Flores Abuxapqui, J., Escobedo Ortegón, J., Cañas, R. y Sánchez Moreno, M. (2016) 'Diagnosis of Congenital Chagas Disease Using an Iron Superoxide Dismutase Excreted as Antigen, in Mothers and Their Children During the First Year of Life', *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35(7), pp. 739–743.

CREM, Centro Regional de Estadística de Murcia (2016) Padrón Municipal de habitantes de la Región de Murcia. Disponible en: http://econet.carm.es/web/crem/inicio//crem/sicrem/PU_padron/series/sec7.html

Corrêa, V. R., Barbosa, F. G., Melo Junior, C. A., D'Albuquerque e Castro, L. F., Andrade Junior, H. F. y Nascimento, N. (2014) 'Uneventful benznidazole treatment of acute Chagas disease during pregnancy: a case report', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(3), pp. 397–400.

Cortez, C., Yoshida, N., Bahia, D. y Sobreira, T. J. (2012) 'Structural basis of the interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface molecule implicated in oral infection with host cells and gastric mucin', *PloS One*, 7(7), p. e42153.

Cunha-Neto, E., Duranti, M., Gruber, A., Zingales, B., De Messias, I., Stolf, N., Bellotti, G., Patarroyo, M.E., Pilleggi, F., y Kalil, J. (1995) 'Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, pp. 3541-3545.

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. y Martelli, C. M. (1996) 'Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection', *Lancet*, 348(9039), pp. 1407–1413.

De Rissio, A. M., Riarte, A. R., García, M. M., Esteva, M. I., Quaglino, M. y Ruiz, A. M. (2010) 'Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(5), pp. 838–845.

del Puerto, F., Sánchez, Z., Nara, E., Meza, G., Paredes, B., Ferreira, E. y Russomando, G. (2010) '*Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(3), pp. 386–390.

Delgado, M. A. y Santos-Buch, C. A. (1978) 'Transplacental transmission and fetal parasitosis of *Trypanosoma cruzi* in outbred white Swiss mice', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 27(6), pp. 1108–1115.

Díaz, M. L. y González, C. I. (2014) 'Enfermedad de Chagas agudo: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente', *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 46(2), pp. 177–188.

Disko, R. y Krampitz, H. (1971) 'Das Auftreten von *Trypanosoma cruzi* in der Milch infizierter Mause', 22, pp. 56–66.

Dorn, P. L., Perniciaro, L., Yabsley, M. J., Roellig, D. M., Balsamo, G., Diaz, J. y Wesson, D. (2007) 'Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana', *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), pp. 605–607.

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. y 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 Neglected Tropical Diseases*, 7(1), p. e2000.

Fabbro, D. L., Danesi, E., Olivera, V., Codebó, M. O., Denner, S., Heredia, C., Streiger, M. y Sosa-Estani, S. (2014) 'Trypanocide treatment of women infected with

Trypanosoma cruzi and its effect on preventing congenital Chagas', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(11), p. e3312.

Fabbro, D. L., Streiger, M. L., Arias, E. D., Bizai, M. L., Del Barco, M. y Amicone, N. A. (2007) 'Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 40(1), pp. 1–10.

Fabbro, D. S., Arias, E., Streiger, M., Piacenza, Ingaramo, M., Del Barco, M. y Amicone, N. (2000) 'Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 42(2), pp. 99–109.

Fernandes, C. D., Tiecher, F. M., Balbinot, M. M., Liarte, D. B., Scholl, D., Steindel, M. y Romanha, A. (2009) 'Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(1), pp. 27–32.

Fernandez-Aguilar, S., Lambot, M. A., Torrico, F., Alonso-Vega, C., Córdoba, M., Suarez, E., Noël, J. C. y Carlier, Y. (2005) '[Placental lesions in human *Trypanosoma cruzi* infection]', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, pp. 84–86.

Fernández-Villegas, A., Thomas, M. C., Carrilero, B., Téllez, C., Marañón, C., Murcia, L., Moralo, S., Alonso, C., Segovia, M. y López, M. C. (2014) 'The innate immune response status correlates with a divergent clinical course in congenital Chagas disease of twins born in a non-endemic country', *Acta Tropica*, 140, pp. 84–90.

Ferreira, C. S., Martinho, P. C., Amato Neto, V. y Cruz, R. R. (2001) 'Pasteurization of human milk to prevent transmission of Chagas disease', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 43(3), pp. 161–162.

Flores-Chávez, M., Fuentes, I., Gárate, T. y Cañavate, C. (2007) 'Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada', 25 Supl 3, pp. 29–37.

Forés, R., Sanjuán, I., Portero, F., Ruiz, E., Regidor, C., López-Vélez, R., Linares, M., Gil, S., Ojeda, E., Krsnik, I., Bautista, G., Vallejo, C., García-Marco, J., Fernández, M. N. y Cabrera, J. R. (2007) 'Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation', *Bone Marrow Transplantation*, 39(2), pp. 127–128.

Freilij, H. y Altcheh, J. (1995) 'Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects', *Clinical Infectious Diseases*, 21(3), pp. 551–555.

Freilij, H., Altcheh, J. y Muchinik, G. (1995) 'Perinatal human immunodeficiency virus infection and congenital Chagas' disease', *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 14(2), pp. 161–162.

Freilij, H., Muller, L. y Gonzalez Cappa, S. M. (1983) 'Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease', *Journal of Clinical Microbiology*, 18(2), pp. 327–330.

Fumadó, V., Juncosa, T., Posada, E., Fisa, R., Gállego, M. y Gascón, J. (2014) 'Chagas pediátrico en zona no endémica', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(5), pp. 293–296.

García, A., Ortiz, S., Iribarren, C., Bahamonde, M. I. y Solari, A. (2014) 'Congenital co-infection with different *Trypanosoma cruzi* lineages', *Parasitology International*, 63(1), pp. 138–139.

García, M. M., De Rissio, A. M., Villalonga, X., Mengoni, E. y Cardoni, R. L. (2008) 'Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors (sTNF-R1 and -R2) in pregnant women chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and their children', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(3), pp. 499–503.

García-Bournissen, F., Altcheh, J., Giglio, N., Mastrantonio, G., Della Védova, C. O. y Koren, G. (2009) 'Pediatric clinical pharmacology studies in Chagas disease: focus on Argentina', *Paediatric Drugs*, 11(1), pp. 33–37.

Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez i Prat, J., Herrera, R.N., La Fuente, C.A., Luciardi, H.L., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., y Sergio-Salles, X. (2007) 'Diagnosis, management and treatment of

chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic', *Revista española de cardiología*, 60(3), pp. 285-293.

González-Tomé, M. I., Rivera Cuello, M., Camaño Gutierrez, I., Norman, F., Flores-Chávez, M. D., Rodríguez-Gómez, L., Fumadó, V., García-López Hortelano, M., López-Vélez, R., González-Granado, L. I., García-Burguillo, A., Santos Sebastian, M. D. M. y Avila Arzanegui, O (2013) 'Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. ', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), pp. 535–542.

Guhl, F. (2009) 'Enfermedad de Chagas: realidad y perspectivas', *Revista Biomédica*, 20, pp. 228–34.

Hermann, E., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Rodriguez, P., Berthe, A., Torrico, F. y 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', *The Journal of Infectious Diseases*, 189(7), pp. 1274–1281.

Herwaldt, B. L. (2001). 'Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures', *Clinical Microbiology Reviews*, 14, pp. 659-688.

Hotez, P. J., Molyneux, D. H., Fenwick, A., Kumaresan, J., Sachs, S. E., Sachs, J. D. y Savioli, L. (2007) 'Control of neglected tropical diseases', *The New England Journal of Medicine*, 357(10), pp. 1018–1027.

Howard, E. J., Xiong, X., Carlier, Y., Sosa-Estani, S. y Buekens, P. (2014) 'Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis', *BJOG: an international journal of obstetrics and gynaecology*, 121(1), pp. 22–33.

Howard, J. y Rubio, M. (1968) 'Congenital Chagas' disease. I. Clinical and epidemiological study of 30 cases', *Boletín chileno de parasitología*, 23(3), pp. 107–112.

Iborra-Bendicho, M. A., Albert-Hernández, M., Márquez-Contreras, C. y Segovia-Hernández, M. (2012) '[ARCHITECT Chagas®]: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30(8), pp. 463–465.

Imaz-Iglesia, I., García-San Miguel, L., Ayala-Morillas, L. E., García-Pérez, L., González-Enríquez, J., Blasco-Hernández, T., Martín-Águeda, M. B. y Sarría-Santamera, A. (2015) 'Economic evaluation of Chagas disease screening in Spain', *Acta Tropica*, 148, pp. 77–88.

Junqueira, A. C., Chiari, E. y Wincker, P. (1996) 'Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil', *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), pp. 129–132.

Kaplinski, M., Jois, M., Galdos-Cardenas, G., Rendell, V. R., Shah, V., Do, R. Q., Marcus, R., Pena, M. S., Abastoflor Mdel. C., LaFuente, C., Bozo, R., Valencia, E., Verastegui, M., Colanzi, R., Gilman, R. H. y Bern, C. (2015) 'Sustained Domestic Vector Exposure Is Associated With Increased Chagas Cardiomyopathy Risk but Decreased Parasitemia and Congenital Transmission Risk Among Young Women in Bolivia', *Clinical Infectious Diseases*, 61(6), pp. 918-926.

Kierszenbaum, F. (1999) 'Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis', *Clinical microbiology reviews*, 12, pp. 210-223.

Kirchhoff, L.V. (2006) 'American Trypanosomiasis. Chagas disease'. En: Guerrant, R.L., Walker, D.H. y Weller, P.F. Eds. *Tropical Infectious Diseases. Principles, Pathogens and Practice*. Churchill Livingstone: Elsevier. pp. 1082-1094.

Kirchhoff, L. V., Votava, J. R., Ochs, D. E. y Moser, D. R. (1996) 'Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*', *Journal of Clinical Microbiology*, 34(5), pp. 1171–1175.

Kropf, S. P. (2011) 'Carlos Chagas: science, health, and national debate in Brazil', *Lancet*, 377(9779), pp. 1740–1741.

Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E. y Hotez, P. J. (2013) ‘Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model’, *The Lancet. Infectious Diseases*, 13(4), pp. 342–348.

Len, O. y Pahissa, A. (2007) ‘[Donor-transmitted infections]’, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(3), pp. 204–212.

Leon, J.S., y Engman, D.M. (2001) ‘Autoimmunity in Chagas heart disease’. *International journal for parasitology*, 31, pp. 555-561.

Mallimaci, M. C., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Sanchez, Z., Sijvarger, C., Alvarez, I. M., Barrionuevo, L., Lopez, C. y Segura, E. L. (2010) ‘Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection, using shed acute phase antigen, in Ushuaia, Tierra del Fuego, Argentina’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82(1), pp. 55–59.

Martins, L. P., Castanho, R. E., Nogueira, A. B., Silva, O. T. y Gusmão, A. S. (2011) ‘Incidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease’, *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(2), pp. 116–118.

Mathers, C. D., Ezzati, M. y Lopez, A. D. (2007) ‘Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(2), p. e114.

Mazza, S., Montaña, A., Benitez, C. y Janzi, E. C. (1983) [Transmisión de *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas]. Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (M.E.P.R.A) 1936; 28, pp. 41–46. En: Medina-Lopes MD, Macedo V. *Trypanossoma cruzi* no colostro humano. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 16, p. 170.

Medina-Lopes, M. D. (1992) [Transmissao materno-infantil da doença de Chagas]. Brasilia, 1983 (Dissertação de Mestrado-Nucleo de Medicina Tropical e Nutrição da Universidade de Brasilia). En: Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical

transmission of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 34, pp. 403–408.

Medina-Lopes, M das D. (1988) '[Transmission of *Trypanosoma cruzi* in a case, during lactation, in a non-endemic area]', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 21(3), pp. 151–153.

Menezes, C. A., Bitterncourt, A. L., Mota, E., Sherlock, I. y Ferreira, J. (1992) '[The assessment of parasitemia in women who are carriers of *Trypanosoma cruzi* infection during and after pregnancy]', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 25(2), pp. 109–113.

Messenger, L. A., Miles, M. A. y Bern, C. (2015) 'Between a bug and a hard place: *Trypanosoma cruzi* genetic diversity and the clinical outcomes of Chagas disease', *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 13(8), pp. 995–1029.

Miles, M. A. (1972) '*Trypanosoma cruzi*--milk transmission of infection and immunity from mother to young', *Parasitology*, 65(1), pp. 1–9.

Mjihdi, A., Lambot, M. A., Stewart, I. J., Detournay, O., Noël, J. C., Carlier, Y. y Truyens, C. (2002) 'Acute *Trypanosoma cruzi* infection in mouse induces infertility or placental parasite invasion and ischemic necrosis associated with massive fetal loss', *The American Journal of Pathology*, 161(2), pp. 673–680.

Molina, I., Salvador, F. y Sánchez-Montalvá, A. (2016) 'Actualización en enfermedad de Chagas', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, pp. 132–138.

Molina, I., Salvador, F. y Sánchez-Montalvá, A. (2014) 'Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease', *The New England Journal of Medicine*, 371(10), p. 966.

Moncayo, A. y Silveira, A. C. (2009) 'Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, pp. 17–30.

Mora, M. C., Sanchez Negrette, O., Marco, D., Barrio, A., Ciaccio, M., Segura, M. A. y Basombrío, M. A. (2005) 'Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection

using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology', *The Journal of Parasitology*, 91(6), pp. 1468–1473.

Moretti, E., Basso, B., Castro, I., Carrizo Paez, M., Chaul, M., Barbieri, G., Canal Feijoo, D., Sartori, M. J. y Carrizo Paez, R. (2005) 'Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38(1), pp. 53–55.

Moscatelli, G., Moroni, S., García-Bournissen, F., Ballering, G., Bisio, M., Freilij, H. y Altchek, J. (2015) 'Prevention of congenital Chagas through treatment of girls and women of childbearing age', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(4), pp. 507–509.

Moser, D. R., Kirchhoff, L. V. y Donelson, J. E. (1989) 'Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction', *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), pp. 1477–1482.

Muñoz, J., Coll, O., Juncosa, T., Vergés, M., del Pino, M., Fumado, V., Bosch, J., Posada, E. J., Hernandez, S., Fisa, R., Boguña, J. M., Gállego, M., Sanz, S., Portús, M. y Gascón, J. (2009) 'Prevalence and Vertical Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection among Pregnant Latin American Women Attending 2 Maternity Clinics in Barcelona, Spain', *Clinical Infectious Diseases*, 48(12), pp. 1736–1740.

Muñoz, M. J., Murcia, L. y Segovia, M. (2011) 'The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease', *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 9(1), pp. 5–7.

Murcia, L., Simón, M., Carrilero, B., Roig, M. y Segovia, M. (2017) 'Treatment of infected women of childbearing age prevents congenital *Trypanosoma cruzi* infection by eliminating the parasitemia detected by PCR', *The Journal of Infectious Diseases*.

Murcia, L., Carrilero, B., Ferrer, F., Roig, M., Franco, F. y Segovia, M. (2016) 'Success of benznidazole chemotherapy in chronic *Trypanosoma cruzi*-infected patients with a sustained negative PCR result', *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(11), pp. 1819–1827.

Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz-Davila, M. J., Thomas, M. C., López, M. C. y Segovia, M. (2013) 'Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country', *Clinical Infectious Diseases*, 56(4), pp. 496–502.

Murcia, L., Carrilero, B., Albajar Viñas, P. y Segovia, M. (2012) 'Nifurtimox chemotherapy: collateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients', *Revista Espanola de Quimioterapia*, 25(1), pp. 74–75.

Murcia, L., Carrilero, B., Muñoz, M. J., Iborra, M. A. y 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', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), pp. 1759–1764.

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., y Tanowitz, H.B. (2012) 'Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease'. *Cellular microbiology*, 6.

Navarro, M., Navaza, B., Guionnet, A. y López-Vélez, R. (2012) 'Chagas disease in Spain: need for further public health measures', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(12), p. e1962.

Nisida, I. V., Amato Neto, V., Braz, L. M., Duarte, M. I. y Umezawa, E. S. (1999) 'A survey of congenital Chagas' disease, carried out at three health institutions in São Paulo City, Brazil', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 41(5), pp. 305–311.

Nóbrega, A. A., Garcia, M. H., Tatto, E., Obara, M. T., Costa, E., Sobel, J. y Araujo, W. N. (2009) 'Oral transmission of Chagas disease by consumption of acai palm fruit, Brazil', *Emerging Infectious Diseases*, 15(4), pp. 653-655.

Norman, F. F. y López-Vélez, R. (2013) 'Chagas disease and breast-feeding', *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), pp. 1561–1566.

Oliveira, F. da C., Chapadeiro, E., Alonso, M. T., Lopes, E. R. y Pereira, F. E. (1966) '[Chagas disease and pregnancy. I. Incidence of trypanosomiasis and spontaneous

abortion in pregnant women with chronic Chagas disease]’, *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 8(4), pp. 184–185.

Oliveira, R. B., Troncon, L. E., Dantas, R.O. y Menghelli, U. G. (1998) ‘Gastrointestinal manifestations of Chagas disease’, *The American Journal of Gastroenterology*, 93, pp. 884-9.

Oliveira, I., Torrico, F., Muñoz, J. y Gascon, J. (2010) ‘Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach’, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 8(8), pp. 945–956.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2017) ‘La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana)’. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

OMS, Organización Mundial de la Salud (2015) ‘Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates’, *Weekly Epidemiological Record*, 90, pp. 33–44.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2003) ‘Control de la enfermedad de Chagas’. Ginebra: WHO Press.

OMS, Organización Mundial de la Salud (2002) ‘Control of Chagas disease: second report of the WHO Expert Committee, technical report series n° 905’. Ginebra: WHO.

OPS, Organización Panamericana de la Salud (2006) ‘Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas OPS/HDM/CD/425-06’. Washington: PAHO

Ortiz, S., Zulantay, I., Solari, A., Bisio, M., Schijman, A., Carlier, Y. y Apt, W. (2012) ‘Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases’, *Acta Tropica*, 124(3), pp. 243–246.

Pérez-Aguilar, M. C., Alarcón, M., Araujo, S. y Goncalves, L. (2012) ‘[Effect of congenital infection by *Trypanosoma cruzi* on intrauterine development and the fetal-neonatal immune response].’, *Investigacion clinica*, 53(2), pp. 190–204.

Pérez-Molina, J. A., Perez, A. M., Norman, F. F., Monge-Maillo, B. y López-Vélez, R. (2015) 'Old and new challenges in Chagas disease', *The Lancet Infectious Diseases*, 15(11), pp. 1347–1356.

Pinto, C. M., Kalko, E. K., Cottontail, I., Wellinghausen, N. y Cottontail, V. M. (2012) 'TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(6), pp. 1328–1332.

Piron, M., Vergés, M., Muñoz, J., Casamitjana, N., Sanz, S., Maymó, R. M., Hernández, J. M., Puig, L., Portús, M., Gascón, J. y Sauleda, S. (2008) 'Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain)', *Transfusion*, 48(9), pp. 1862–1868.

Prata, A. (2001) 'Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease', *The Lancet infectious diseases*, 1, pp. 92-100.

Qvarnstrom, Y., Schijman, A. G., Veron, V., Aznar, C., Steurer, F. y 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 Neglected Tropical Diseases*, 6(7), p. e1689

Ramos, J. M., Pinargote, H., Andreu, M., Sastre, J., Torrus, D., Martinez-Escoriza, J. C. y 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', *Epidemiology and Infection*, 142(4), pp. 888–890.

Ramos, J. M., Milla, A., Rodríguez, J. C., López-Chejade, P., Flóres, M., Rodríguez, J. M. y Gutiérrez, F. (2012) 'Chagas disease in Latin American pregnant immigrants: experience in a non-endemic country', *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 285(4), pp. 919–923.

Rassi, A., Amato Neto, V., Rassi, G. G., Amato, V. S., Rassi Júnior, A., Luquetti, A. O. y Rassi, S. G. (2004) '[A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase]', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(6), pp. 485–489.

Rassi, A. Jr., Rassi, A. y Marin-Neto, J. A. (2010) 'Chagas disease', *Lancet*, 375(9723), pp. 1388–1402.

Rassi Jr, A., Rassi, A. y Marin-Neto, J. A. (2009) 'Chagas heart disease: pathophysiologic mechanisms, prognostic factors and risk stratification', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, pp. 152–158.

Requena-Méndez, A., Albajar-Viñas, P., Angheben, A., Chiodini, P., Gascón, J., Muñoz, J. y Chagas Disease COHEMI Working Group (2014) 'Health policies to control Chagas disease transmission in European countries', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), p. e3245.

Rezende, J. (2007) 'Diagnóstico de las manifestaciones digestivas de la enfermedad de Chagas', 2007, 9, pp. 22–7.

Ríos, J.F., Arboleda, M., Montoya, A.N., y Alarcón, E.P. (2011) 'Probable brote de transmisión oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia', *Biomédica*, 31, pp. 185-195.

Roca, C., Soriano-Arandes, A., Solsona, L. y Gascón, J. (2015) 'Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas', *Atención Primaria*, pp. 308–317.

Roca, C., Pinazo, M. J., López-Chejade, P., Bayó, J., Posada, E., López-Solana, J., Gállego, M., Portús, M., Gascón, J. y Chagas-Clot Research Group (2011) 'Chagas disease among the Latin American adult population attending in a primary care center in Barcelona, Spain', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(4), p. e1135.

Rodriguez, P., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Flores, A., Cordova, M., Suarez, E., Torrico, F. y Carlier, Y. (2005) '[Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-*trypanosoma cruzi* in samples of blood from newborns from mothers with positive serology for Chagas disease]', *Revista da Sociedade brasileira de Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, pp. 62–64.

Romero, M., Postigo, J., Schneider, D., Chippaux, J. P., Santalla, J. A. y Brutus, L. (2011) 'Door-to-door screening as a strategy for the detection of congenital Chagas

disease in rural Bolivia', *Tropical medicine and international health*, 16(5), pp. 562–569.

Russomando, G., Sánchez, Z., Meza, G. y de Guillen, Y. (2010) 'Shed acute-phase antigen protein in an ELISA system for unequivocal diagnosis of congenital Chagas disease', *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 10(6), pp. 705–707.

Russomando, G., de Tomassone, M. M., de Guillen, I., Acosta, N., Vera, N., Almiron, M., Candia, N., Calcena, M. F. y Figueredo, A. (1998) 'Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(3), pp. 487–491.

Salas, N. A., Cot, M., Schneider, D., Mendoza, B., Santalla, J. A., Postigo, J., Chippaux, J. P. y Brutus, L. (2007) 'Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia', *Tropical medicine and international health*, 12(12), pp. 1498–1505.

Salomone, Ó. A. (2003) 'Miocardiopatía chagásica y trombosis: el principio y el final de una relación peligrosa', *Revista Española de Cardiología*, 56(04), pp. 333–334.

Sánchez Negrette, O., Mora, M. C. y Basombrío, M. A. (2005) 'High prevalence of congenital *Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina', *Pediatrics*, 115(6), pp. e668-672.

Santos Ferreira, C., Amato Neto, V., Gakiya, E., Bezerra, R. C. y Alarcón, R. S. (2003) 'Microwave treatment of human milk to prevent transmission of Chagas disease', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 45(1), pp. 41–42.

Scapellato, P. G., Bottaro, E. G. y Rodríguez-Brieschke, M. T. (2009) 'Mother-child transmission of Chagas disease: could coinfection with human immunodeficiency virus increase the risk?', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(2), pp. 107–109.

Schenone, H., Contreras, M. C., Borgoño, J. M., Rojas, A. y Villarroel, F. (1985) '[Congenital Chagas' disease in Chile. Longitudinal study of the reproductivity of women with or without Chagas' disease and of some parasitological and clinical

parameters of them and their corresponding children].’, *Boletín chileno de parasitología*, 40(1–2), pp. 24–9.

Schijman, A. G., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejía Jaramillo, A. M., Cura, C., Auter, F., Veron, V., Qvarnstrom, Y., Deborggraeve, S., Hijar, 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. y Ladzins, J. (2011) ‘International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients’, *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(1), p. e931.

Schijman, A. G. (2006) ‘Congenital Chagas Disease’, *Perspectives in Medical Virology*, 13, pp. 223–258.

Schijman, A. G., Altcheh, J., Burgos, J. M., Biancardi, M., Bisio, M., Levin, M. J. y Freilij, H. (2003) ‘Aetiological treatment of congenital Chagas’ disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction’, *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(3), pp. 441–449.

Sesti-Costa, R., Silva, J. S. y Gutierrez, F. R. (2012) ‘Congenital Chagas disease: time to screen pregnant women?’, *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 10(11), pp. 1279–1282.

Sicuri, E., Muñoz, J., Pinazo, M. J., Posada, E., Sanchez, J., Alonso, P. L. y Gascon, J. (2011) ‘Economic evaluation of Chagas disease screening of pregnant Latin American women and of their infants in a non endemic area’, *Acta Tropica*, 118(2), pp. 110–117.

Siriano Lda, R., Luquetti, A. O., Avelar, J. B., Marra, N. L. y de Castro, A. M. (2011) ‘Chagas disease: increased parasitemia during pregnancy detected by hemoculture’, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(4), pp. 569–574.

Solana, M. E., Celentano, A. M., Tekiel, V., Jones, M. y González Cappa, S. M. (2002) 'Trypanosoma cruzi: effect of parasite subpopulation on murine pregnancy outcome', *The Journal of Parasitology*, 88(1), pp. 102–106.

Solari, A., Ortíz, S., Soto, A., Arancibia, C., Campillay, R., Contreras, M., Salinas, P., Rojas, A. y Schenone, H. (2001) 'Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(4), pp. 515–519.

Sosa-Estani, S., Colantonio, L. y Segura, E. L. (2012) 'Therapy of chagas disease: implications for levels of prevention', *Journal of Tropical Medicine*, 2012, p. 292138.

Sosa-Estani, S., Cura, E., Velazquez, E., Yampotis, C. y Segura, E. L. (2009) 'Etiological treatment of young women infected with *Trypanosoma cruzi*, and prevention of congenital transmission', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42(5), pp. 484–487.

Sosa-Estani, S., Segura, E. L., Ruiz, A. M., Velazquez, E., Porcel, B. M. y Yampotis, C. (1998) 'Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 59(4), pp. 526–529.

Souto, R. P., Fernandez, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A. y Zingales, B. (1996) 'DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*', *Molecular and Biochemical Parasitology*, 83, pp. 141-152.

Stanaway, J. D. y Roth, G. (2015) 'The burden of Chagas disease: estimates and challenges', *Global Heart*, 10(3), pp. 139–144.

Streiger, M. L., del Barco, M. L., Fabbro, D. L., Arias, E. D. y Amicone, N. A. (2004) '[Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina]', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(5), pp. 365–375.

Strout, R. G. (1962) 'A method for concentrating hemoflagellates', *The Journal of Parasitology*, 48, p. 100.

Teixeira, A. R., Hecht, M. M., Guimaro, M. C., Sousa, A. O. y Nitz, N. (2011) 'Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity', *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), pp. 592–630.

Toledo, M. J., Bahia, M. T., Veloso, V. M., Carneiro, C. M., Machado-Coelho, G. L., Alves, C. F., Martins, H. R., Cruz, R. E., Tafuri, W. L. y Lana, M. (2004) 'Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes', *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(6), pp. 1045–1053.

Torrice, F., Alonso-Vega, C., Suarez, E., Rodriguez, P., Torrico, M. C., Dramaix, M., Truyens, C. y Carlier, Y. (2004) 'Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(2), pp. 201–209.

Torrice, M. C., Solano, M., Guzmán, J. M., Parrado, R., Suarez, E., Alonso-Vega, C., Truyens, C., Carlier, Y. y Torrico, F. (2005) '[Estimation of the parasitemia in *Trypanosoma cruzi* human infection: high parasitemias are associated with severe and fatal congenital Chagas disease]', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, pp. 58–61.

Vazquez-Prokopec, G. M., Spillmann, C., Zaidenberg, M., Kitron, U. y Gürtler, R. E. (2009) 'Cost-effectiveness of chagas disease vector control strategies in Northwestern Argentina', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 3(1), p. e363.

Velázquez, E. B., Rivero, R., De Rissio, A. M., Malagrino, N., Esteva, M. I., Riarte, A. R. y Ruiz, A. M. (2014) 'Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection', *Acta Tropica*, 137, pp. 195–200.

Villalba, R., Fornés, G., Alvarez, M. A., Román, J., Rubio, V., Fernández, M., García, J. M., Viñals, M. y Torres, A. (1992) 'Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report', *Clinical Infectious Diseases*, 14(2), pp. 594–595.

Villar, J. C., Perez, J. G., Cortes, O. L., Riarte, A., Pepper, M., Marin-Neto, J. A. y Guyatt, G. H. (2014) 'Trypanocidal drugs for chronic asymptomatic *Trypanosoma cruzi* infection', *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, (5), p. CD003463.

Viotti, R., Alarcón de Noya, B., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M. J., Guhl, F., López, M. C., Ramsey, J. M., Ribeiro, I., Schijman, A. G., Sosa-Estani, S., Torrico, F., Gascon, J. y Latin American Network for Chagas Disease, NHEPACHA, (2014) 'Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), pp. 635–639.

Viotti, R., Vigliano, C., Alvarez, M. G., Lococo, B., Petti, M., Bertocchi, G., Armenti, A., De Rissio, A. M., Cooley, G., Tarleton, R. y Laucella, S. (2011) 'Impact of aetiological treatment on conventional and multiplex serology in chronic Chagas disease', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(9), p. e1314.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, M. G., Postan, M. y Armenti, A. (2006) 'Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial', *Annals of Internal Medicine*, 144(10), pp. 724–734.

Virreira, M., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Brutus, L., Jijena, J., Torrico, F., Carlier, Y. y Svoboda, M. (2007) 'Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(1), pp. 102–106.

Virreira, M., Alonso-Vega, C., Solano, M., Jijena, J., Brutus, L., Bustamante, Z., Truyens, C., Schneider, D., Torrico, F., Carlier, Y. y Svoboda, M. (2006) 'Congenital Chagas disease in Bolivia is not associated with DNA polymorphism of *Trypanosoma cruzi*', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 75(5), pp. 871–879.

Virreira, M., Torrico, F., Truyens, C., Alonso-Vega, C., Solano, M., Carlier, Y. y Svoboda, M. (2003) 'Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68(5), pp. 574–582.

Volta, B. J., Russomando, G., Bustos, P. L., Scollo, K., De Rissio, A. M., Sánchez, Z., Cardoni, R. L. y Bua, J. (2015) 'Diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection: A serologic test using Shed Acute Phase Antigen (SAPA) in mother-child binomial samples', *Acta Tropica*, 147, pp. 31–37.

Wincker, P., Bosseno, M. F., Britto, C., Yaksic, N., Cardoso, M. A., Morel, C. M. y Brenière, S. F. (1994) 'High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area', *FEMS microbiology letters*, 124(3), pp. 419–423.

Yoshida, N. (2006) 'Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*', *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1), pp. 87–111.

Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G. y Sturm, N. R. (2012) 'The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications', *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), pp. 240–253.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R., 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. y Schijman, A. G. (2009) 'A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI', *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), pp. 1051–1054