



UNIVERSIDAD DE MURCIA

Departamento de Genética y Microbiología

“Enfermedad de Chagas en fase crónica.
Evaluación de diferentes métodos diagnósticos
en una zona no endémica”

M^a Asunción Iborra Bendicho

2013

A mi madre, *in memoriam*

Y llegó la hora de los agradecimientos...

No me voy a extender porque estas cosas no se me dan nada bien, pero no puedo dejar de agradecer a mi director, el Dr. Manuel Segovia, su confianza y apoyo continuo, sin el que no hubiera sido posible que este proyecto llegara a su fin.

Y como no, a todas aquellas personas que en mayor o menor medida han contribuido para que este día se hiciera realidad.

ÍNDICE GENERAL

I- INTRODUCCIÓN.....	1
1- Breve reseña histórica	3
2- <i>Trypanosoma cruzi</i>. Características generales	5
2.1- Taxonomía.....	5
2.2- Ciclo biológico.....	5
2.3- Ciclo epidemiológico	7
2.4- Epidemiología molecular.....	9
2.5- Patogenia de la enfermedad de Chagas	12
3- Enfermedad de Chagas. Aspectos epidemiológicos. Prevención y control.....	14
3.1- Prevalencia y distribución geográfica de la enfermedad.....	14
3.2- Modos de transmisión.....	17
3.2.1- Modos de transmisión en zona endémica.....	17
3.2.2- Modos de transmisión en zona no endémica.....	19
3.3- Prevención y control de la enfermedad.....	22
4- Enfermedad de Chagas. Aspectos clínicos	25
4.1- Manifestaciones clínicas	25
4.1.1- Fase aguda	25
4.1.2- Fase crónica	26
4.1.2.1- Afectación cardíaca.....	27
4.1.2.2- Afectación digestiva	27
4.1.2.3- Afectación del sistema nervioso periférico	28
4.2- Tratamiento	29
5- Coinfección <i>Trypanosoma cruzi</i> con otros patógenos	32
5.1- <i>Helicobacter pylori</i>	32
5.2- Helmintos	35
5.2.1- Geohelmintos y <i>Schistosoma</i>	35
5.2.2- Nematodos: <i>Trichinella spiralis</i>	37

6- Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas	38
6.1- Diagnóstico parasitológico	40
6.2- Diagnóstico serológico	43
6.2.1- Diagnóstico serológico convencional	44
6.2.2- Diagnóstico serológico no convencional	45
6.3- Procedimientos diagnósticos en la enfermedad de Chagas	47
II- OBJETIVOS	51
III- MATERIALES Y MÉTODOS	55
1- Pacientes y muestras clínicas	57
1.1- Muestras empleadas en el estudio de la valoración/comparación entre las técnicas de diagnóstico parasitológico y serológico	60
1.2- Muestras empleadas en la evaluación de un ensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)	60
1.3- Muestras empleadas en el estudio del reconocimiento del péptido sintético 3973	61
1.4- Muestras empleadas en el estudio de coinfección <i>Trypanosoma cruzi</i> con otros patógenos	62
2- Medio de cultivo	62
3- Obtención de formas tripomastigotes de <i>T. cruzi</i>.....	63
4- Extracción de proteínas totales de formas tripomastigotes y amastigotes de <i>T. cruzi</i>.....	63
5- Síntesis del péptido 3973.....	63
6- Técnicas parasitológicas	64
6.1- Concentración de Strout.....	64
6.2- Hemocultivo.....	64
6.3- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	65
6.3.1- Extracción de ADN a partir de sangre total	65
6.3.2- Amplificación de ADN por PCR.....	65
7- Técnicas serológicas	67
7.1- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)	67
7.1.1- Detección de anticuerpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	67
7.1.2- Detección de anticuerpos anti- <i>Leishmania donovani</i>	67
7.2- Inmunocromatografía (ICT)	68

7.3- Enzimoinmunoensayos (EIA)	68
7.3.1- ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay) <i>in house</i>	68
7.3.1.1- Determinación de anticuerpos frente al lisado de antígenos solubles de <i>T. cruzi</i>	68
7.3.1.2- Determinación de anticuerpos frente al péptido sintético 3973	69
7.3.2- EIAs comerciales	70
7.3.2.1- Detección de anticuerpos anti- <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
7.3.2.2- Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)	73
7.3.2.3- Detección de anticuerpos anti- <i>Helicobacter pylori</i>	74
7.3.2.4- Detección de anticuerpos frente a helmintos (<i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Strongyloides stercoralis</i> , <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Trichinella spiralis</i>)	75
8- Análisis estadístico.....	76
9- Consideraciones éticas	77
IV- RESULTADOS	79
1- Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica mediante técnicas parasitológicas.....	81
1.1- Microscopía óptica	81
1.2- Hemocultivo.....	81
1.3- Utilización de la PCR como herramienta diagnóstica.....	81
2- Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica mediante técnicas serológicas	83
2.1- Pruebas convencionales y no convencionales.....	88
2.1.1- Comparación de la reactividad de diferentes técnicas de diagnóstico serológico	88
2.1.2- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo	92
2.1.3- Estudio de la reactividad cruzada	93
2.1.4- Impacto de la reactividad cruzada en la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo	93
2.1.5- Análisis de concordancia de las diferentes técnicas serológicas	95

2.1.6- Detección de anticuerpos anti- <i>Leishmania</i> en los sueros de pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas.....	96
2.2- Diagnóstico mediante ELISA empleando el péptido sintético 3973 ...	97
2.2.1- Reconocimiento del péptido sintético 3973 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica sin tratamiento previo.....	97
2.2.2- Reconocimiento del péptido sintético 3973 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica con tratamiento previo con benznidazol.....	103
2.2.2.1- Cambios en la respuesta antígeno específica frente al péptido sintético 3973 tras el tratamiento con benznidazol	106
2.3- Evaluación de un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas	109
3- Prevalencia de infección por <i>Helicobacter pylori</i> en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.....	111
3.1- Especificidad del péptido 3973 en pacientes con enfermedad de Chagas y coinfección con <i>Helicobacter pylori</i>	113
4- Seroprevalencia de helmintiasis en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.....	115
4.1- Geohelminthos y <i>Schistosoma</i>	115
4.1.1- Especificidad del péptido sintético 3973 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y coinfección con helmintos.....	117
4.2- <i>Trichinella spiralis</i>	118
V- DISCUSIÓN	121
VI- CONCLUSIONES	151
VII- BIBLIOGRAFÍA	155

1- Breve reseña histórica

La enfermedad de Chagas debe su nombre al médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano de Chagas, quien la descubrió en 1909 (Chagas, 1909). Es el único caso en la historia de la medicina en la que se descubre al mismo tiempo y por la misma persona una enfermedad infecciosa, el microorganismo que la produce y el agente biológico que la transmite, además de todos los aspectos de la enfermedad.



Carlos Justiniano Ribeiro Chagas (1879-1934), nació en Oliveira, Minas Gerais, Brasil, el 9 de julio de 1879. Después de la muerte de su padre, su madre, a la edad de 24 años y con cuatro hijos pequeños, se hizo cargo de la pequeña plantación familiar. Su deseo era convertirse en ingeniero de minas, pero su tío, un médico, le abrió los ojos al azote que las enfermedades endémicas planteaban al desarrollo de Brasil. En 1886, Chagas entró en la Escuela de medicina de Río de Janeiro y en 1902 comenzó su doctorado, que realizó sobre los aspectos hematológicos de la malaria. Ese mismo año conoció a Oswaldo Cruz, que trabajaba en Maguinhos, un centro dedicado principalmente a la producción de sueros y vacunas (actualmente el Instituto Oswaldo Cruz). Fue en Maguinhos donde Cruz había comenzado su lucha contra las enfermedades tropicales. Chagas rechazó la oferta de Cruz para unirse a Maguinhos porque le atraía más la medicina clínica.

En 1905, sin embargo, por razones económicas, aceptó la oferta de Cruz para unirse a la lucha contra la malaria y su prevención en Itatinga, Sao Paulo. La ciudad era donde la Companhia Docas de Santos estaba construyendo una central hidroeléctrica, y muchos trabajadores de la compañía contraían malaria. Una tarea similar llevó a cabo Chagas a Xerém, en la Baixada Fluminense, donde la Dirección General de Obras públicas estaba construyendo los sistemas de captación de agua para la ciudad de Río de Janeiro. Mientras tanto, se había unido finalmente al Instituto Maguinhos.

En 1907, durante una campaña de prevención contra la malaria, en Minas Gerais, estableció su laboratorio en un vagón de ferrocarril. Allí identificó un nuevo *Trypanosoma* sp. (*Trypanosoma minanense*) que era un parásito no patógeno de un mono tití. También describió el insecto hematófago conocido como “barbeiro”, y encontró las formas de un protozoo en el intestino que pensaba que podrían ser parásitos de vertebrados, por ejemplo, una etapa del ciclo biológico de *T. minanense*. Chagas envió algunos insectos a Maguinhos, donde Cruz los puso en contacto con monos tití sanos, que resultaron infectados con el tripanosoma.

De vuelta en Maguinhos, Chagas descubrió que la tripanosomiasis era una nueva especie que él llamó *Trypanosoma cruzi*. Chagas encontró *T. cruzi* en la sangre de un gato y poco después en la sangre de una niña que había estado en contacto con el gato. Tuvo éxito en la reproducción de la enfermedad de forma experimental, y describió sus rasgos clínicos, etiológicos, patológicos y epidemiológicos. La enfermedad pronto fue conocida como enfermedad de Chagas, a raíz de la sugerencia de Miguel Couto de la Escuela de Medicina de Río de Janeiro.

En 1910, Chagas se convirtió en miembro de la Academia Brasileña de Medicina, y en 1917, después de la muerte de Oswaldo Cruz fue nombrado director del Instituto Maguinhos.

A pesar de que Chagas murió prematuramente a los 55 años de edad, vivió lo suficiente para presenciar la creación en su honor, de una Cátedra de Medicina Tropical en la Universidad de Río de Janeiro, e incluso ocupó la cátedra los últimos años de su vida, mientras que también dirigía el Centro Internacional de Leprología en Río de Janeiro.

2- *Trypanosoma cruzi*. Características generales

2.1- Taxonomía

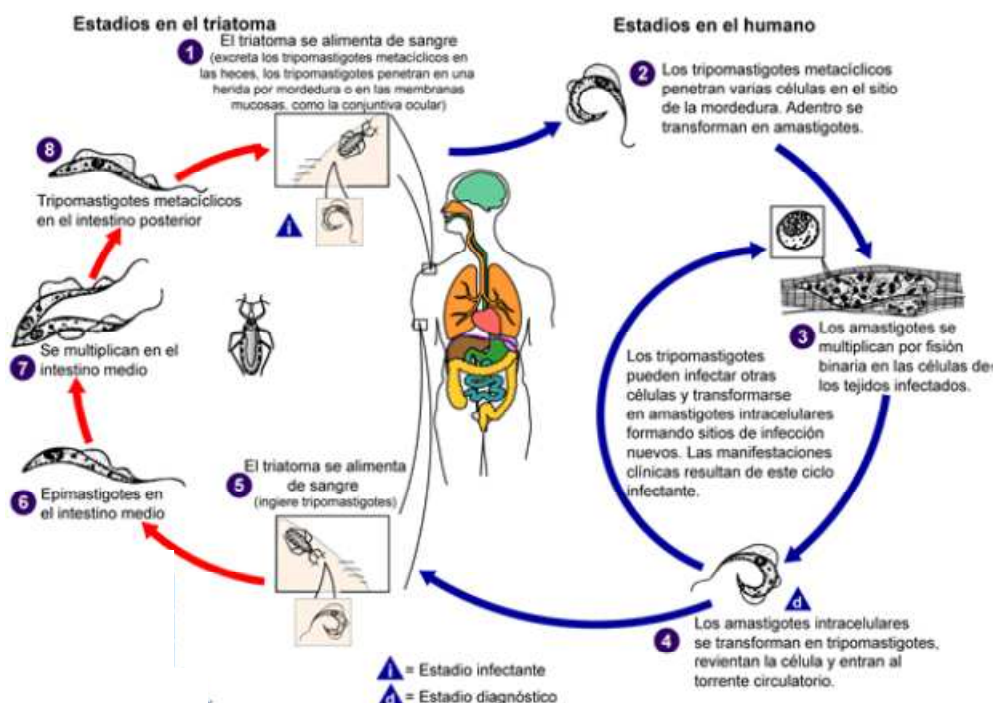
T. cruzi pertenece al subphylum *Mastigophora* del phylum *Sarcomastigophora*, orden *Kinetoplastida*, que comprende organismos flagelados con un kinetoplasto, organelo localizado en la mitocondria y que contiene ADN. *T. cruzi* se incluye en la sección estercoraria, junto con el grupo de tripanosomas cuyo estadio infeccioso se desarrolla en el interior del tracto digestivo del vector y contamina a los hospedadores mamíferos a través de sus heces. El subgénero *Schizotrypanum* ha sido adoptado por los tripanosomas que se multiplican en los vertebrados vía estadios intracelulares. Por tanto, el nombre taxonómico completo es *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*.

2.2- Ciclo biológico

T. cruzi se transmite, en más del 80% de los casos cuando hablamos de áreas endémicas, a través de la picadura de insectos triatomíneos, hematófagos obligados de hábitos nocturnos que constituyen el principal mecanismo de transmisión en la naturaleza.

T. cruzi posee un ciclo de vida complejo que incluye la infección del hospedador vertebrado y la transmisión por insectos vectores (Figura 1). Este parásito pasa por tres estadios morfológicos principales: la forma amastigote no flagelada y las formas flageladas epimastigote y tripomastigote (Brener, 1973, 1981). La forma epimastigote prolifera en el insecto vector y eventualmente se diferencia para dar lugar a los tripomastigotes metacíclicos, capaces de infectar al hospedador vertebrado. 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 amastigotes, los cuales sufren varios ciclos de división. Seguidamente, los amastigotes se diferencian, pasando por formas intermedias de morfología similar a los epimastigotes, a tripomastigotes sanguíneos que son liberados

por ruptura de la célula anfitriona, iniciando el siguiente ciclo de infección. Las formas tripomastigotes son una población pleomórfica, constituida principalmente por dos morfologías básicas, descritas como *slender* y *broad*. Las formas *slender* pueden invadir nuevamente las células de forma similar a los tripomastigotes metacíclicos. Además, células infectadas prematuramente lisadas, pueden liberar formas amastigotes, las cuales pueden también infectar células particularmente fagocíticas. La ingestión de los tripomastigotes sanguíneos por parte del insecto vector (*Rhodnius*, *Triatoma*, etc.), permite que se complete el ciclo de vida del parásito al diferenciarse el tripomastigote en formas amastigotes replicativas conocidas como esferoamastigotes. Como paso intermedio a los esferoamastigotes, todas las formas tripomastigotes sanguíneas pasan por una morfología *broad* (Tyler y Engman, 2001). Seguidamente, estas formas se transforman en epimastigotes replicativos. Es importante destacar que la invasión de las células y la replicación intracelular son esenciales para la inducción de la enfermedad y la continuación del ciclo de vida del parásito.



Fuente: Center for Disease Control and Prevention (CDC)

Figura 1. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.

2.3- Ciclo epidemiológico

La enfermedad de Chagas puede considerarse una zoonosis que afecta al ser humano cuando este se introduce en un ecosistema salvaje, o cuando los triatominos se adaptan al ambiente del ser humano atraídos bien por la luz, o por la necesidad de alimentarse de sangre de mamíferos (Coura y Junqueira, 2012). Existen tres tipos de ciclos epidemiológicos: ciclo doméstico, ciclo peridoméstico y ciclo selvático (Deane, 1964).

Ciclo doméstico. La estructura de las casas rurales o periurbanas las hace especialmente vulnerables a la infección por triatominos; las paredes de adobe, los techos de paja y las grietas ofrecen un hábitat ideal para la domiciliación de estos insectos. Además, la estrecha asociación entre los habitantes y los animales domésticos constituye una fuente de sangre abundante y de fácil acceso, por lo que se alcanzan grandes densidades de vectores en el interior de estas viviendas. En las comunidades donde la enfermedad es endémica, del 25 al 100% de las casas pueden estar infestadas, pudiendo albergar estas y sus alrededores grandes colonias de vectores adultos y jóvenes (Levy y col., 2006; Mott y col., 1978; Pless y col., 1992).



Figura 2. Principales especies de vectores de la enfermedad de Chagas en seres humanos **A)** *Triatoma infestans* **B)** *Rhodnius prolixus*

Ciclo peridoméstico. Este ciclo sirve de nexo entre el ciclo doméstico y el ciclo selvático. En él encontramos 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 el alimento.

Ciclo selvático. En este ciclo 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 Méjico. En este ciclo selvático, los mamíferos también pueden adquirir la infección al ingerir triatominos infectados.

Tabla 1. Principales especies de triatominos que predominan en los ciclos domésticos y peridomésticos y juegan un papel importante en la epidemiología de la enfermedad de Chagas en América Latina (OMS, 2002).

Vector	Localización
<i>Triatoma infestans</i>	Argentina ^a , Bolivia, Brasil ^b , Chile ^b , Paraguay ^a , sur de Perú, Uruguay ^b
<i>Rhodnius prolixus</i>	Colombia, El Salvador, Guatemala ^b , Honduras, sur de Méjico, Nicaragua, Venezuela
<i>Triatoma dimidiata</i>	Belice, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Honduras, Méjico, Nicaragua, Panamá, norte de Perú, Venezuela
<i>Panstrongylus megistus</i>	Argentina, Brasil, Paraguay, Uruguay
<i>Triatoma brasiliensis</i>	noreste de Brasil

^a La transmisión de *T. cruzi* se ha declarado interrumpida en 6 provincias de Argentina y en el departamento I de Paraguay.

^b La transmisión ha sido declarada interrumpida en todo el país.

2.4- Epidemiología molecular

T. cruzi es una especie genéticamente heterogénea que se caracteriza por una amplia variabilidad en sus características biológicas y bioquímicas (Macedo y Pena, 1998; Miles y col., 2003; Campbell y col., 2004). Los diferentes clones de *T. cruzi* circulan tanto en ciclos domésticos como selváticos, afectando a seres humanos, insectos vectores y animales (Macedo y col., 1998).

Debido a la falta de un consenso inicial, los aislados han recibido diferentes denominaciones (Souto y col., 1996) que han llevado a una gran confusión. Históricamente, *T. cruzi* se ha dividido en dos grandes grupos, TcI y TcII; este último a su vez se subdividió en cinco subgrupos (también llamados unidades discretas de tipificación [DTU]) designados como TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId, TcIIe. Recientemente se ha alcanzado un consenso por el que se ha modificado la denominación de estos seis linajes (Zingales y col., 2009). De este modo, TcI permanece como tal, y TcIIa, TcIIb, TcIIc, TcIId y TcIIe se denominan como TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI, respectivamente.

Tabla 2. Equivalencia de los genotipos de *Trypanosoma cruzi*.

Designación						
Linaje	2	1	1/2 ^a	1/2 ^a		
Linaje actual	TcI	TcIII	TcV	TcVI	TcIV	TcII
DTU	TcI	TcIIb	TcIId	TcIIe	TcIIc	TcIIa
Grupo	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II				
Linaje ancestral	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II	Híbridos		<i>T. cruzi</i> III	

^a 1/2 aislados con características del linaje 1 y linaje 2

Debido a la complejidad antes mencionada, no se ha establecido una asociación bien definida entre los genotipos de *T. cruzi* y la evolución de la infección humana, si bien está mejor documentada su relación geográfica.

En líneas generales, el genotipo TcI está implicado tanto en ciclos domésticos como selváticos, siendo transmitido principalmente por triatomíneos del género *Rhodnius*. Este genotipo se ha descrito en la mayoría de países del continente americano y se detecta con mayor frecuencia en casos de infección aguda y en las formas cardíacas de la infección crónica. Los genotipos IIb (TcII), IId (TcV) y IIe (TcIV) son los más frecuentes en América del sur. Estos tres genotipos están asociados principalmente al ciclo doméstico y al vector *Triatoma infestans*. TcIId (TcV) y TcIIe (TcIV) han sido descritos en pacientes con afectación cardíaca y digestiva del Cono Sur (Carranza y col., 2009; Miles y col., 2009). Por el contrario, la enfermedad de Chagas crónica con manifestaciones digestivas es poco frecuente en la parte norte de América del Sur, Central y México donde TcI es el linaje predominante. El genotipo TcIIc (TcIII) se ha descrito con más frecuencia en ciclos selváticos de América del Sur y junto con el genotipo TcIIa (TcIV) sólo infecta de forma esporádica a seres humanos (Bern y col., 2011).

En la Figura 3 se observa la distribución geográfica predominante de los seis genotipos de *T. cruzi* (Petherick, 2010).

Algunos estudios han demostrado que la variabilidad genética de *T. cruzi* tiene impacto en la variabilidad antigénica y puede influir en el diagnóstico de la infección (di Noia y col., 2002).

Un aspecto importante de la epidemiología molecular de *T. cruzi*, reside en la diferente susceptibilidad al tratamiento farmacológico exhibida por los diferentes genotipos. La existencia de cepas de *T. cruzi* con resistencia intrínseca (Filardi y Brener, 1987; Murta y col., 2008) ha sido considerado como uno de los factores que podría explicar la baja tasa de curación en algunos pacientes con Chagas tratados en zonas endémicas. Esto se ha observado en la zona centro de Brasil en pacientes infectados con cepas del tipo TcI, comparadas con aquellos infectados con cepas TcII (Andrade y Magalhaes, 1996). Determinados estudios han demostrado que TcIII, es altamente resistente (Andrade y Magalhaes, 1996; Toledo y col., 2003, 2004).

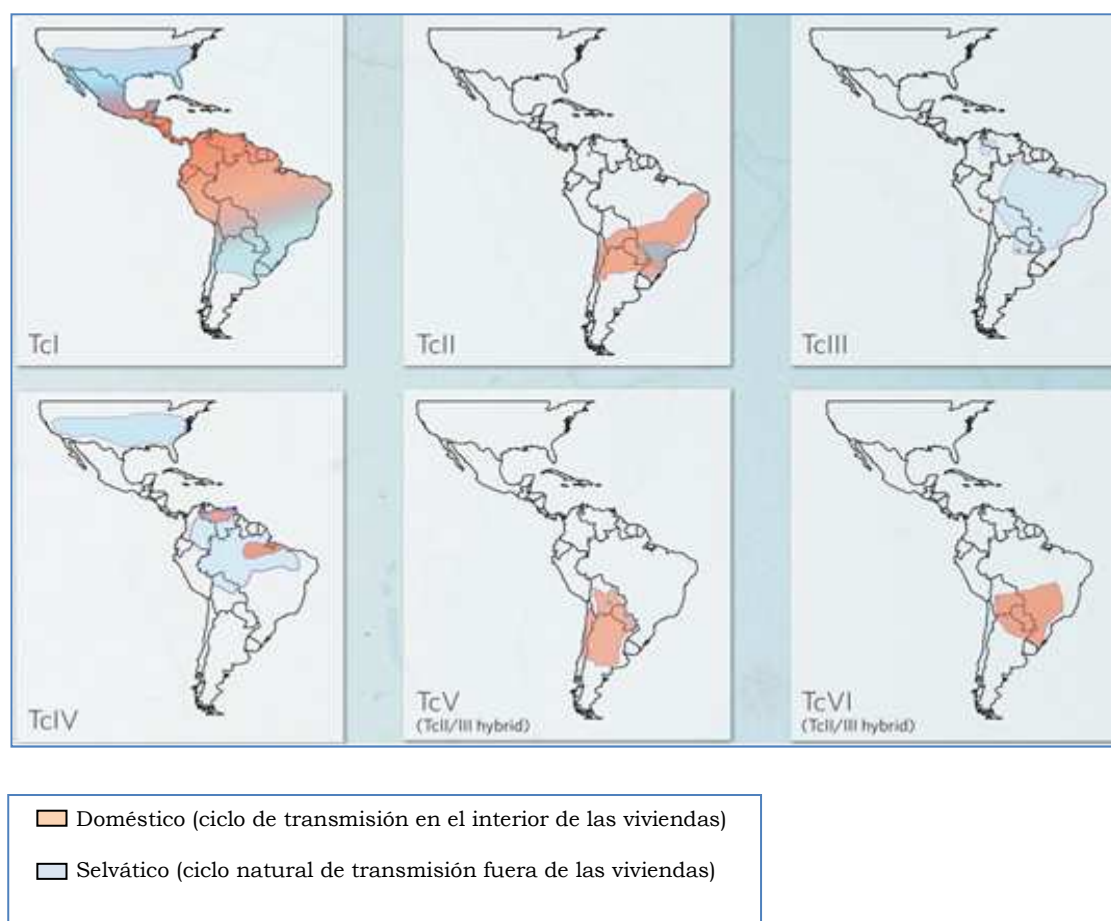


Figura 3. Distribución aproximada de los linajes de *Trypanosoma cruzi*. TcI es el principal responsable de la enfermedad de Chagas en el norte del Amazonas; TcII, TcV y TcVI en la región del Cono Sur; TcIII y TcIV infecta al hombre esporádicamente; TcIV tiene genotipos divergentes en el Norte y Sur de América.

Recientemente, se ha descrito la existencia de una alta incidencia de infecciones mixtas en seres humano (Solari y col., 2001) y vectores (Bossaro y col., 2000). Este hecho suscita interrogantes acerca de las consecuencias relacionadas con la morbilidad, la dinámica de transmisión del parásito y la respuesta a la quimioterapia, pudiendo explicar la variabilidad de la respuesta al tratamiento en pacientes fase crónica tratados con benznidazol (Brenière y col., 1998).

Por otra parte, se ha sugerido que la epidemiología molecular podría desempeñar un papel importante en el riesgo de transmisión congénita, ya

que se han descrito tasas variables de transmisión en áreas geográficas diferentes donde predominan cepas distintas del parásito. El genotipo TcIIId (TcV) es el que más frecuentemente se ha descrito en infecciones congénitas. No obstante, este hecho podría estar reflejando el predominio de este genotipo en Bolivia y Argentina, países en los que se han llevado a cabo estos estudios (Navin y col., 1985; Corrales y col., 2009). Además, en los casos de transmisión congénita todavía se desconoce si la población completa de *T. cruzi* materna o tan solo determinados clones se transmiten a través de la placenta (Andrade, 1982).

2.5- Patogenia de la enfermedad de Chagas

Las lesiones tisulares en pacientes con enfermedad de Chagas se pueden explicar a través de dos teorías: la persistencia del parásito y la autoinmunidad (Texeira y col., 2011).

La teoría de la persistencia del parásito en el ser humano surgió a partir de la detección de formas amastigotes de *T. cruzi* en tejido cardíaco de un niño que falleció de infección aguda (Vianna, 1911). De acuerdo con esta teoría, el parásito penetra en la célula del hospedador y establece una infección crónica, persistiendo a pesar de activar la respuesta inmune en el ser humano (Nagajyothi y col., 2012). La división del amastigote en el interior celular produce la ruptura mecánica de la célula y la liberación del parásito al exterior atrayendo células inflamatorias, lo que explicaría las lesiones características a nivel cardíaco y digestivo de la fase crónica de la enfermedad (Texeira y col., 2011).

La teoría de la autoinmunidad se fundamenta en la demostración de reacciones cruzadas de los anticuerpos del propio ser humano frente a epítopos que presentan motivos aminoacídicos similares, o con una conformación tridimensional semejante a ciertos determinantes antigénicos del parásito (Cunha-Neto y col., 1995; Kierszenbaum, 1999; Leon y Engman, 2001).

Durante muchos años los métodos tradicionales parasitológicos directos (microscopía, hemocultivo y xenodiagnóstico), menos sensibles

que los moleculares, no pudieron demostrar la presencia del parásito en los tejidos dañados, y así varios estudios postularon el fenómeno autoinmune como el mecanismo principal responsable del daño cardíaco tardío (Cunha-Neto y col., 1996; Rassi y col., 2001; Iwai y col., 2005; Marin-Neto y col., 2007). Esta hipótesis se basa en la ausencia aparente de parásitos en lesiones cardíacas inflamatorias, y en la presencia de respuestas autoinmunes en pacientes con cardiopatía chagásica causada por auto anticuerpos o células T auto reactivas del hospedador (Kalil y Cunha-Neto, 1996; Girones y col., 2005).

Sin embargo, la demostración de la presencia de *T. cruzi* en el miocardio mediante métodos más sensibles (inmunohistoquímica, PCR), sugieren que la presencia del parásito es necesaria para el inicio y mantenimiento de la respuesta inflamatoria (Higuchi y col., 1993; Jones y col., 1993; Lane y col., 1997). Así, el papel que desempeña el parásito es crítico, y por ello la terapia antiparasitaria puede prevenir la progresión de la enfermedad en la fase crónica (Urbina y Docampo, 2003).

En conjunto, los resultados sugieren que la persistencia del parásito en órganos y tejidos es el estímulo primario para perpetuar la inflamación, y es responsable de incrementar la respuesta inmune frente al parásito (Fernandes y Andrews, 2012). Por tanto, el tratamiento etiológico debería centrarse en el aclaramiento de la parasitemia. Pocos estudios han demostrado la eficacia del tratamiento en la fase crónica de la enfermedad, pero la demostración del parásito en tejidos diana impide atribuir la etiopatogenia exclusivamente a mecanismos inmunológicos (Villa y col., 2007). Algunos estudios han puesto de manifiesto que el tratamiento con benznidazol en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, retrasa o previene la progresión clínica hacia formas graves cardíacas, pero no se ha demostrado que sea capaz de eliminar el parásito (Viotti y col., 1994; Cancado, 2002).

En la actualidad, la mayoría de los autores coinciden en que la persistencia del parásito en los tejidos a bajas concentraciones, induce daño tisular debido a una respuesta inflamatoria que es la responsable de

la actividad autoinmune observada en la enfermedad de Chagas (Machado y col., 2010).

3- Enfermedad de Chagas. Aspectos epidemiológicos. Prevención y control

3.1- Prevalencia y distribución geográfica de la enfermedad

La enfermedad de Chagas es un fenómeno permanente en casi el 25% de la población latinoamericana. Existe una amplia variedad en las tasas de prevalencia, vías de transmisión, características de los parásitos, patología clínica y reservorios, según el área geográfica considerada. A pesar de los adelantos en los estudios epidemiológicos de la enfermedad, sigue resultando difícil determinar con exactitud su incidencia y prevalencia.

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida desde la latitud 42°N (Sur de Estados Unidos) a la latitud 46°S (Sur de Chile y Argentina), afectando a 21 países de Latinoamérica (Figura 4). Sin embargo, la distribución de vectores silvestres y reservorios es mayor a la de la enfermedad humana (OMS, 1991).

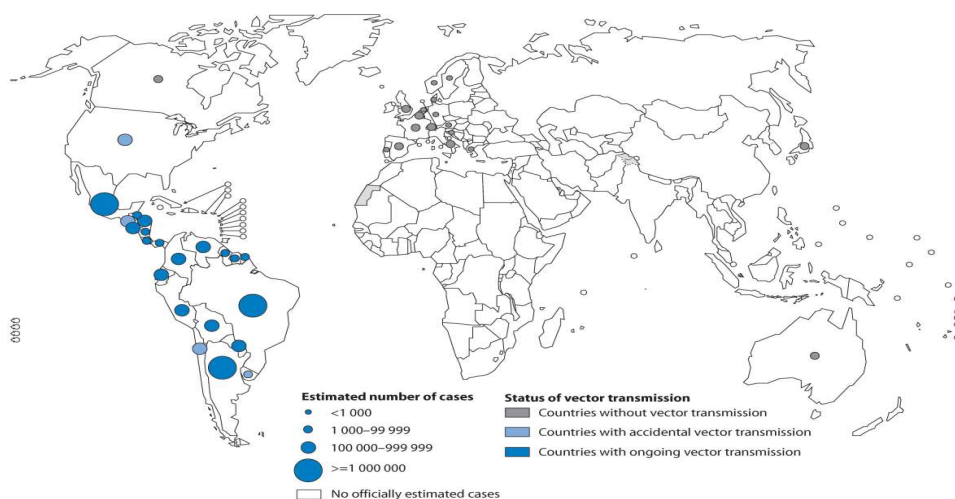


Figura 4. Distribución de casos de infección por *T. cruzi*, basado en estimaciones oficiales y estado de la transmisión vectorial en todo el mundo (2006-2009) (OMS, 2010_a).

Los cambios económicos y sociales que se han producido en las últimas décadas, han estimulado la migración humana desde las áreas rurales hacia las ciudades, lo que ha favorecido que las tasas de incidencia, mortalidad y prevalencia estén en constante cambio. Se desconoce el número exacto de infectados, si bien la OMS estima que afecta aproximadamente a unos 10 - 12 millones de personas, y entre un 20-30% de ellos desarrollarán enfermedad grave (OMS, 2005) (Tabla 3).

Tabla 3. Países donde la enfermedad de Chagas es endémica y estimación de la seroprevalencia y número de personas infectadas.

Región	País endémico ^a	Seroprevalencia estimada (%) ^b	Estimación del n° de individuos infectados ^b
América del Norte	México	1,03	1.100.000
América Central	Belice	0,74	2.000
	Costa Rica	0,54	23.000
	El Salvador	3,37	232.000
	Honduras	3,05	220.000
	Guatemala	1,98	250.000
	Nicaragua	1,14	58.600
	Panamá	0,01	21.000
América del Sur	Argentina	4,13	1.600.000
	Bolivia	6,75	620.000
	Brasil	1,02	1.900.000
	Chile	0,99	160.200
	Colombia	0,96	436.000
	Ecuador	1,74	230.000
	Guyana	1,29	18.000
	Surinam	ND	ND
	Guayana Francesa	ND	ND
	Paraguay	2,54	150.000
	Perú	0,69	192.000
	Uruguay	0,66	21.700
	Venezuela	1,16	310.000

^a País o zonas de ese país donde existe transmisión vectorial, o se producía hasta hace poco

^b Estimaciones del año 2005 (Bern y Montgomery, 2009; OPS, 2006). ND, datos no disponibles

La globalización, y con ella los grandes movimientos migratorios poblacionales, ha tenido repercusiones no sólo en el ámbito político, social y económico, sino también en el sanitario. En los últimos años ha ido

aumentando el número de personas de origen latinoamericano que ha emigrado a zonas no endémicas, como es nuestro país (Figura 5). Existen pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas en Europa, en España se estima que en el año 2009, entre 40.000 y 65.000 residentes estaban infectados por *T. cruzi* (OMS, 2010b), mientras que en otros países europeos el rango estimado oscilaba entre 12.000 y 15.000 (Guerri-Gutemberg y col., 2008).

España es sin duda uno de los países europeos que recibe más inmigrantes procedentes de América Latina, con una desigual distribución en las diferentes comunidades autónomas. En la Región de Murcia los datos del avance del Padrón municipal de 2012 (INE, 2012) registraron unas cifras de 71.702 personas de este origen, de las cuales 3.708 procedían de América Central y 67.994 de América del Sur y el 51,2% eran mujeres.

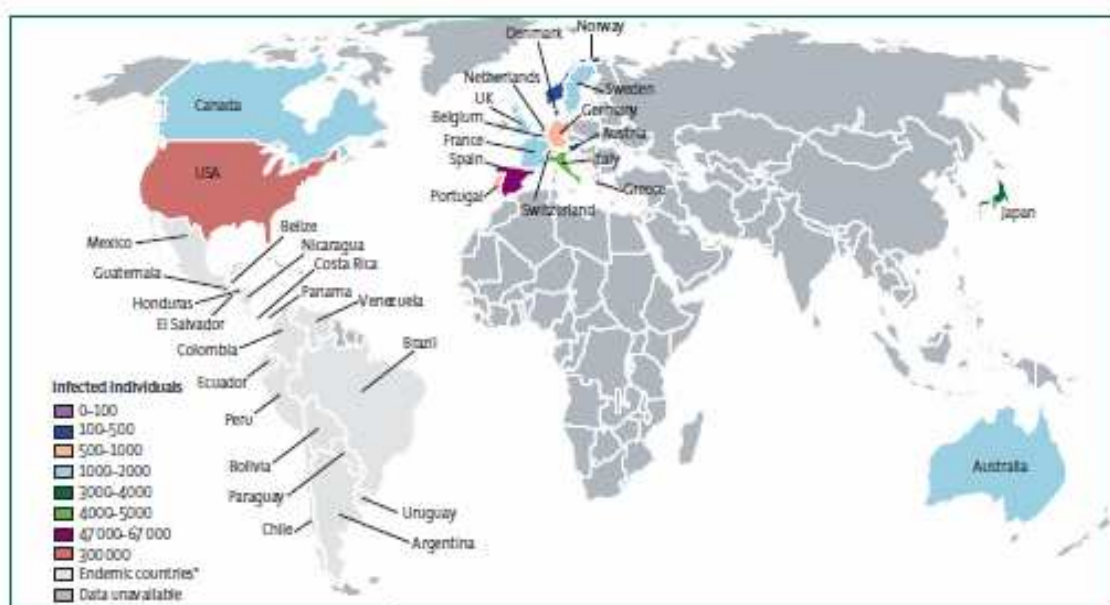


Figura 5. Estimación del número de inmigrantes con infección por *Trypanosoma cruzi* viviendo en zonas no endémicas. Datos proporcionados por Canadá, Australia y Japón en 2006 (Schmunis, 2007), Estados Unidos en 2005 (Bern y Montgomery, 2009), España en 2008 (Gascón y col., 2010) y otros países europeos en 2004-06 (Guerri-Guttemberg y col., 2008).

3.2- Modos de transmisión

3.2.1-Modos de transmisión en zona endémica

Transmisión vectorial. La transmisión vectorial se produce exclusivamente en América, donde continua siendo el principal mecanismo de adquirir la infección. La enfermedad de Chagas es transmitida a las personas y a más de 150 especies de animales domésticos y animales salvajes (roedores, marsupiales y armadillos) por insectos reduvidos de la subfamilia *Triatominae*. Aunque se han identificado más de 130 especies de triatominos, sólo unos cuantos son vectores competentes para *T. cruzi* (Lent y Wygodzinsky, 1979; Galvao y col., 2003). Las tres especies de vectores más importantes en la transmisión de la enfermedad al hombre son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* (OMS, 2002).

La infección se produce a través del contacto de la piel abierta o mucosas con las heces de un insecto triatomino infectado (conocido con los nombres de chinche besucona, benchuca, vinchuca, chipo o barbeiro), el cual se alimenta de la sangre de seres humanos y animales.

Transmisión sanguínea. La transmisión por transfusión fue postulada en 1936 y documentada por primera vez en 1952 (Freitas y col., 1952; Wendel y Brener, 1992). La transfusión de sangre completa o hemoderivados (excepto productos liofilizados), es el segundo modo en importancia de adquirir la enfermedad de Chagas en países endémicos, y responsable de aproximadamente el 10% de los casos de infección por *T. cruzi*.

El riesgo de adquirir la infección tras una transfusión de sangre de un donante infectado se estima que oscila entre 10-25% (Schmunis, 1999). En 1991, la prevalencia de infección por *T. cruzi* en donantes de sangre en América Latina variaba del 1 al 60% según las ciudades (Schmunis, 1991).

Transmisión congénita. La probabilidad de transmisión congénita en niños de madres infectadas con enfermedad de Chagas varía del 1-10% (Azogue y Darras, 1991; Basombrio y col., 1999; Torrico y col., 2004). Se

estima que aproximadamente se producen más de 15.000 casos por año de infección congénita por *T. cruzi* (OPS, 2006).

Existe una alta variabilidad en las seroprevalencias reportadas entre mujeres embarazadas en América Latina, con rangos tan dispares que oscilan entre 0,7 y 70,5% (Russomando y col., 2005; Chippaux y col., 2009; Sosa-Estani y col., 2008) dependiendo del país, entorno rural o urbano, edad de la madre (Brutus y col., 2008) y técnica de laboratorio empleada para el cribado (Brutus y col., 2009).

Aunque las prevalencias más altas de infección maternal se siguen describiendo en áreas rurales de Bolivia (Brutus y col., 2007), la mayoría de los países endémicos, en los últimos años, han reportado un descenso de la prevalencia de infección por *T. cruzi* entre los recién nacidos (Torrico y col., 2004). Estos cambios son probablemente un reflejo del éxito de los programas de control de vectores y de las mejoras de las condiciones socioeconómicas (Torrico y col., 2004).

Transmisión por órganos trasplantados. Los receptores sanos de órganos de donantes infectados con *T. cruzi* pueden desarrollar una infección aguda. Sin embargo, la transmisión no es universal; en una serie de 16 receptores de riñón sanos, solo 3 (19%) adquirieron la infección por *T. cruzi* (Riarte y col., 1999). Hasta el momento, se han documentado en la literatura 19 casos de transmisión por órganos trasplantados (13 renales, 1 reno-pancreático, 3 hepáticos, 2 cardíacos) (Barcan y col., 2005; CDC, 2002; Chocair y col., 1981; Kun y col., 2009; Riarte y col., 1999; Souza y col., 2008). Se ha demostrado que el riesgo de adquirir la infección es mayor cuando se trata de un trasplante cardíaco que de un trasplante renal o hepático (Chin-Hong y col., 2011).

Transmisión oral. Recientemente, se ha incrementado la atención en la ruta de transmisión oral por ingestión de alimentos contaminados con triatominos o sus deyecciones. Se han producido varios brotes atribuidos a fruta contaminada o zumo de caña de azúcar en Brasil y Venezuela (Beltrao y col., 2009; de Noya y col., 2010; Nobrega y col., 2009). La mayoría de los brotes son pequeños y afectan a grupos familiares en la

región Amazónica, donde la fruta de la palma es un componente importante de su dieta y parece ser particularmente susceptible a la contaminación, probablemente debido a que los vectores viven en estos árboles (Coura y col., 2002). El mayor brote hasta la fecha, afectó a más de 100 personas, entre estudiantes y profesores, de una escuela en Caracas; el zumo de guayaba preparado localmente fue el responsable (de Noya y col., 2010).

La transmisión de *T. cruzi* a través de la leche materna sólo ha sido sugerida en una ocasión (Medinas-Lopes, 1988), ya que la mayoría de estudios ha descartado la presencia del parásito en la leche de mujeres con enfermedad de Chagas crónica (Bittencourt, 1988; Amato y col., 1992). Además, las formas tripomastigotes del torrente sanguíneo materno, a diferencia de los tripomastigotes metacíclicos presentes en el vector, no son capaces de sobrevivir al jugo gástrico (Hoft, 1996; Hoft y col., 1996), lo que impediría su transmisión al recién nacido.

Transmisión accidental. Otro modo de transmisión menos frecuente sería la contaminación accidental durante el trabajo en el laboratorio, donde se incluye la ruta conjuntival a través de los aerosoles formados durante la centrifugación o pinchazos con jeringas contaminadas (Herwaldt, 2001).

3.2.2- Modos de transmisión en zona no endémica

Dado que los vectores y el reservorio animal sólo se hallan en el continente americano, en los países no endémicos, como es el caso de España, la transmisión es exclusivamente interhumana mediante mecanismo horizontal, como la donación de órganos o hemoderivados, y vertical o materno-fetal (Gascón, 2005); formas de transmisión evitables si se realiza un control correcto.

Transmisión sanguínea. En países no endémicos, la transfusión sanguínea es una de las principales vías de adquirir la infección (Schmunis, 1991).

Debido al aumento progresivo de los casos de enfermedad de Chagas en España, desde septiembre de 2005, la legislación española en el Real Decreto 1088/2005 (BOE, 2005), establece la necesidad de realizar un cribado universal en todos los donantes con riesgo de estar infectados por *T. cruzi*. Los donantes considerados de riesgo por el Ministerio de Sanidad, incluye a personas nacidas en áreas endémicas, aquellas nacidas de madre nativa de zona endémica, y aquellos que han recibido una transfusión o han pasado largos periodos de tiempo (un mes o más en áreas rurales principalmente) en área endémica.

En los últimos 22 años, antes de la instauración del Real Decreto, se produjeron al menos, seis casos de transmisión de enfermedad de Chagas por transfusión en España (Forés y col., 2007; Flores-Chávez y col., 2008).

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

Transmisión vertical. La transmisión congénita de *T. cruzi* en áreas donde no existe transmisión vectorial, se está convirtiendo en un importante problema sanitario (Brutus y col., 2009; Muñoz y col., 2009).

La transmisión de *T. cruzi* de madre a hijo, al contrario que en otras enfermedades infecciosas de posible transmisión congénita, puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la fase crónica:

- Fase aguda: la transmisibilidad es alta pero la situación infrecuente, por mayor riesgo de infección transplacentaria (Bittencourt, 1992).

- Fase crónica: la transmisibilidad es baja pero la situación mucho más frecuente (Moretti y col., 2005). En nuestro país, donde no existe el vector de la enfermedad, esta posibilidad es la importante, de ahí que resulte crítico el detectar a las mujeres inmigrantes originarias de áreas endémicas, aquellas que hayan vivido en estas áreas o que han recibido transfusiones de sangre en ellas.

En los casos de infección crónica, el paso transplacentario de la enfermedad de Chagas es menos frecuente (escasa parasitemia sin manifestaciones clínicas), y se ha establecido que, por lo general, se produce entre las 19 y las 37 semanas de edad gestacional y es más alto entre las 22 y las 26 semanas. Si la transmisión vertical se produce a una edad gestacional temprana, es posible la presencia de fetopatía.

En las zonas no endémicas en las que se han producido migraciones sin vector de transmisión, se estima que la transmisión madre-hijo se sitúa entre el 5-6% (Brutus y col., 2008).

Entre los factores involucrados para que se produzca la transmisión de la infección de una madre al feto, se cita la cepa de *T. cruzi*, la carga parasitaria en el huésped (Salas y col., 2007), el estado inmunológico (Hermann y col., 2004), la historia obstétrica y el estadio materno (Bittencourt, 1992). Sin embargo, los mecanismos de transmisión materno-fetal del parásito no han sido todavía claramente elucidados. No hay manera de predecir si una mujer infectada transmitirá o no el parásito a su bebé.

En ausencia de transmisión materno-fetal de *T. cruzi*, la infección materna crónica no tiene consecuencias sobre el curso del embarazo y el desarrollo fetal (Torrico y col. 2004; Brabin, 1992; Torrico y col., 2005). Sin embargo, se debe tener en cuenta que si la madre está infectada, el riesgo de transmisión está presente en cada embarazo (Freilij y col., 1994).

En España, sólo algunas comunidades autónomas, como Valencia (Generalitat Valenciana, 2009) y Cataluña (Generalitat de Catalunya, 2010), disponen de protocolos de cribado en las mujeres embarazadas procedentes de América Latina para prevenir la transmisión congénita. El resto de España, no ha adoptado ninguna medida gubernamental preventiva hasta el momento.

3.3- Prevención y control de la enfermedad

La enfermedad de Chagas no puede ser erradicada porque es una zoonosis. El gran número de reservorios animales hace imposible la eliminación de todas las fuentes de infección.

Debido a la escasa eficacia del tratamiento farmacológico y a la inexistencia de una vacuna, el control de la transmisión por *T. cruzi* en países endémicos depende necesariamente del control de la transmisión vectorial (disminución de la población domiciliaria del vector, a través de los programas de fumigación con insecticidas, mejora de las condiciones de las viviendas y sensibilización de las personas vulnerables) y prevención de la transmisión mediante mecanismos no vectoriales. Estas medidas, junto con el cribado serológico de los donantes de sangre, han disminuido de manera notable la transmisión del parásito en muchos países endémicos.

El control de la enfermedad de Chagas también requiere un adecuado tratamiento antiparasitario de los individuos infectados crónicamente (Rassi y col., 2009). Por ello, es urgente la búsqueda y comercialización de nuevas drogas con menos efectos secundarios y una mayor actividad tripanocida. Sin embargo, la eliminación de *T. cruzi* o al menos la reducción de la carga parasitaria en individuos infectados, es posible con los tratamientos disponibles en la actualidad (benznidazol y nifurtimox). De este modo, el tratamiento de pacientes con infección crónica por *T. cruzi* constituye una oportunidad única para detener o ralentizar la progresión de la enfermedad. El suministro limitado de los fármacos nitroimidazólicos en determinadas áreas de América Latina, así como la ausencia de formulaciones pediátricas, suponen una barrera adicional en la lucha contra esta enfermedad.

Además, sería conveniente disponer de mejores ensayos (parasitológicos, serológicos o moleculares), especialmente test rápidos, para el diagnóstico de la fase aguda y crónica, así como para confirmar la cura tras el tratamiento (MSC, 2008).

Principios para el control de la Enfermedad de Chagas

- Control vectorial (fumigación residual, mejora de las viviendas)
- Profilaxis personal (mosquiteras)
- Control serológico en los bancos de sangre
- Tratamiento de las personas infectadas

3.3.1- Iniciativas subregionales para la interrupción de la transmisión

El abordaje subregional adoptado en los diferentes países de Latinoamérica para enfrentar el problema de la enfermedad de Chagas, tiene su fundamento en criterios entomológicos y epidemiológicos, pero en general los objetivos son eliminar la transmisión vectorial y por transfusión del parásito, estableciéndose estrategias de intervención diferenciadas según los criterios mencionados.

Los esfuerzos de la comunidad científica latinoamericana para el control de la enfermedad, han logrado a lo largo de estos últimos años que se reconozca la importancia de la enfermedad, y se establezcan e implementen medidas de control efectivas para sus diferentes formas de transmisión. En la actualidad, existen programas de control en muchas áreas endémicas. De hecho, las “Iniciativas” de los países del Cono Sur, la de los países Andinos y la de los países de Centroamérica están dando sus frutos.

El éxito de las campañas de fumigación en Argentina, Brasil, Chile y Venezuela antes de 1970 (Dias y col., 2002) animó a otros países a adoptar medidas similares. En 1991, Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay formaron la Iniciativa del Cono Sur, dirigida a la eliminación de *Triatoma infestans* y a la interrupción de la transmisión de la enfermedad de Chagas a través de las transfusiones (Schofield y Dias, 1999).

Tras el éxito de estas acciones coordinadas, en 1997, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela formaron la Iniciativa de los Países Andinos para la lucha contra los vectores, implementando estrategias de control adaptadas a las condiciones entomológicas locales. Un año más tarde, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Méjico y Nicaragua se unieron para dar lugar a la Iniciativa de los Países de América Central. Estos dos últimos programas también implementaron el cribado universal de sangre. Hoy en día, la enfermedad de Chagas aguda ha sido eliminada de muchas áreas rurales, y el coste-beneficio de las distintas iniciativas es altamente positivo. La transmisión vectorial ha sido eliminada en Uruguay y Chile, y en amplias partes de Brasil y Argentina. Durante 1999, estimaciones del número de personas infectadas sugerían que la prevalencia estaba disminuyendo (Dias y col., 2002). La cronicidad de la enfermedad y la ausencia de tratamiento en masa, sin embargo, ponen en peligro el control si la vigilancia disminuye una vez alcanzado el objetivo.

El mayor riesgo para el futuro de la enfermedad de Chagas es el que muestran las tendencias actuales de los programas de control en los diferentes países con logros obtenidos. Si bien es cierto que las acciones de control vectorial han permitido la eliminación de insectos vectores domiciliados, lo cual ha dado como resultado un descenso en la incidencia de la enfermedad, todavía hay cerca de 8 a 10 millones de individuos infectados debido a que se presentan escenarios epidemiológicos muy diversos en el continente, razón por la cual aún queda un largo camino por recorrer en el control y la prevención de la enfermedad.

Recientemente, se ha creado la Iniciativa Amazónica, en la cual se reconoce a la enfermedad de Chagas como un problema emergente que debe ser vigilado de manera adecuada por los nueve países que integran la cuenca amazónica. A pesar que durante mucho tiempo se ha considerado una región no endémica, el incremento en los cambios ecológicos asociados a las intensas migraciones humanas, ha posibilitado el aumento casi exponencial del número de casos de infección humana durante la última década.

Es importante en el futuro inmediato plantear estrategias y políticas de control y vigilancia permanente.

4- Enfermedad de Chagas. Aspectos clínicos

4.1- Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas pasa por dos estadios sucesivos: una fase aguda y otra fase crónica (Prata, 2001).

4.1.1- Fase aguda

La enfermedad de Chagas en fase aguda puede ocurrir a cualquier edad, no obstante, la mayoría de los casos se producen en niños menores de 12 años, con una mayor frecuencia en los cinco primeros años de vida. En la mayoría de las personas, independientemente del modo de transmisión, la infección aguda es normalmente asintomática, debido probablemente a la baja carga parasitaria.

Los primeros signos de la enfermedad de Chagas aguda suelen aparecer a la semana de la infestación. En esta etapa, se observan síntomas en el 1-5% de los infectados; en zonas endémicas, los signos clásicos según la puerta de entrada, son el signo de Romaña y el chagoma de inoculación, que es clínicamente evidente en menos del 5% de los casos. El chagoma es una zona eritematosa e indurada en el lugar de entrada del parásito que aparece una o dos semanas después de la picadura del triatomino; suele ser indoloro o levemente doloroso, y se acompaña de adenopatía satélite. El signo de Romaña, se produce cuando la vía de entrada es conjuntival y se manifiesta por edema indoloro, bipalpebral y unilateral. En general, los síntomas son muy inespecíficos, y en ocasiones se confunden con un resfriado común. Los primeros signos se acompañan de malestar general, fiebre, anorexia y edema facial y de extremidades inferiores. También puede cursar con una erupción morbiliforme, linfadenopatías y hepatoesplenomegalia. La miocarditis grave, aunque es poco frecuente, causa la mayor parte de las muertes en la fase aguda

(Acquatella, 2007). Las manifestaciones clínicas neurológicas son raras, pero se han comunicado casos de meningoencefalitis (Maguire, 2004).

En las infecciones congénitas, el 65% de los pacientes permanecen asintomáticos. Los síntomas pueden aparecer al nacer o desarrollarse en las semanas posteriores al nacimiento. Las manifestaciones clínicas más comunes son hipotonicidad, fiebre, hepatoesplenomegalia y anemia. También podemos encontrar prematuridad, bajo peso al nacer y Apgar bajo (Bittencourt, 1976; Freilij y Altcheh, 1995). Las infecciones intrauterinas se han asociado con aborto y placentitis.

La historia natural de la enfermedad de Chagas en el ser humano aparece resumida en la Figura 7.

4.1.2- Fase crónica

Las manifestaciones agudas de la infección por *T. cruzi* desaparecen de forma espontánea en casi todos los enfermos tras 4-8 semanas, dando paso a la fase indeterminada o asintomática crónica. La mayor parte de los individuos infectados nunca desarrollará alteraciones crónicas de la enfermedad, aunque estos puedan ser reconocidos por pruebas serológicas. Se calcula que el 20-30% de las personas infectadas evolucionan a formas sintomáticas (Rassi y col., 2010). Las manifestaciones clínicas pueden ser de diferente gravedad, afectando a diversos órganos, principalmente corazón y sistema digestivo (Figura 6). De forma menos frecuente afecta al sistema nervioso, ocasionando formas neurológicas que son más comunes en inmunodeprimidos (Prata, 2001).



Figura 6. Manifestaciones clínicas más frecuentes en la fase crónica de la enfermedad de Chagas. **A)** Dilatación del corazón **B)** Megaesófago **C)** Megacolon

4.1.2.1- Afectación cardíaca

La forma cardíaca es la manifestación más grave y frecuente de la enfermedad de Chagas crónica. El tipo, la gravedad y el tiempo necesario para el desarrollo de las alteraciones cardíacas son bastante variables y de cierta forma imprevisibles. En cerca del 15-20% de los pacientes, las alteraciones cardíacas serán leves, manifestadas apenas por alteraciones electrocardiográficas (cambios de la conducción intraventricular o atrio-ventricular, arritmias ventriculares no sostenidas y grados variables de disfunción sinusal asintomática) y/o alteraciones discretas de la contractilidad global o segmentaria, sin morbi-mortalidad relevante. En otro 15-20% de los casos, la alteración cardíaca será más acentuada, con afectación más importante de la función ventricular, resultando en insuficiencia cardíaca, bradiarritmias sintomáticas, taquiarritmias ventriculares sostenidas graves, fenómenos tromboembólicos y/o muerte súbita (Carod-Artal, 2006).

4.1.2.2- Afectación digestiva

La frecuencia de afectación digestiva varía según el área geográfica donde nos encontremos, siendo predominante en la parte sur y central de Sudamérica (Argentina, Bolivia, Chile, Paraguay, sur de Perú, Uruguay y centro de Brasil) y casi inexistente en otras zonas endémicas como Venezuela o Colombia.

El 10-15% de los pacientes en fase crónica desarrollarán alteraciones digestivas. *T. cruzi* afecta principalmente al esófago y al colon, siendo más frecuente la primera afectación. En ambos casos la evolución final es hacia un megaesófago y megacolon, respectivamente.

En el caso de megaesófago las alteraciones digestivas que suele causar son: disfagia con odinofagia, combinado con dolor epigástrico, regurgitación, ptialismo, y malnutrición en los casos graves. En estadios avanzados puede producirse esofagitis y más raramente carcinoma de esófago.

El megacolon afecta principalmente a la parte más distal (sigma y recto) (de Rezende y Moreira, 1988), o una combinación de ellos. Los síntomas clínicos que produce son estreñimiento crónico, distensión abdominal, y en estadios avanzados puede provocar obstrucción por la formación de fecalomas en la ampolla rectal, dolor abdominal agudo por vólvulus o perforación por decúbito.

La afectación del colon suele ir acompañada de afectación esofágica, fundamentalmente en edades avanzadas. La afectación esofágica es progresiva en algunos pacientes, evolucionando de manera independiente a la cardiopatía si esta existe.

A pesar de la menor frecuencia y menor gravedad de las alteraciones digestivas en comparación con las cardíacas, éstas suponen un gran sufrimiento para las personas afectadas con un importante deterioro en su calidad de vida.

4.1.2.3- Afectación del sistema nervioso periférico

Mucho menos frecuente que las anteriores, produce una neuritis que se presenta fundamentalmente con parestesia e hipoestesia en miembros y disminución o abolición de los reflejos osteo-tendinosos.

La realización de un electromiograma nos mostrará la destrucción de las neuronas motoras y las fibras sensitivas periféricas (Prata, 2001).

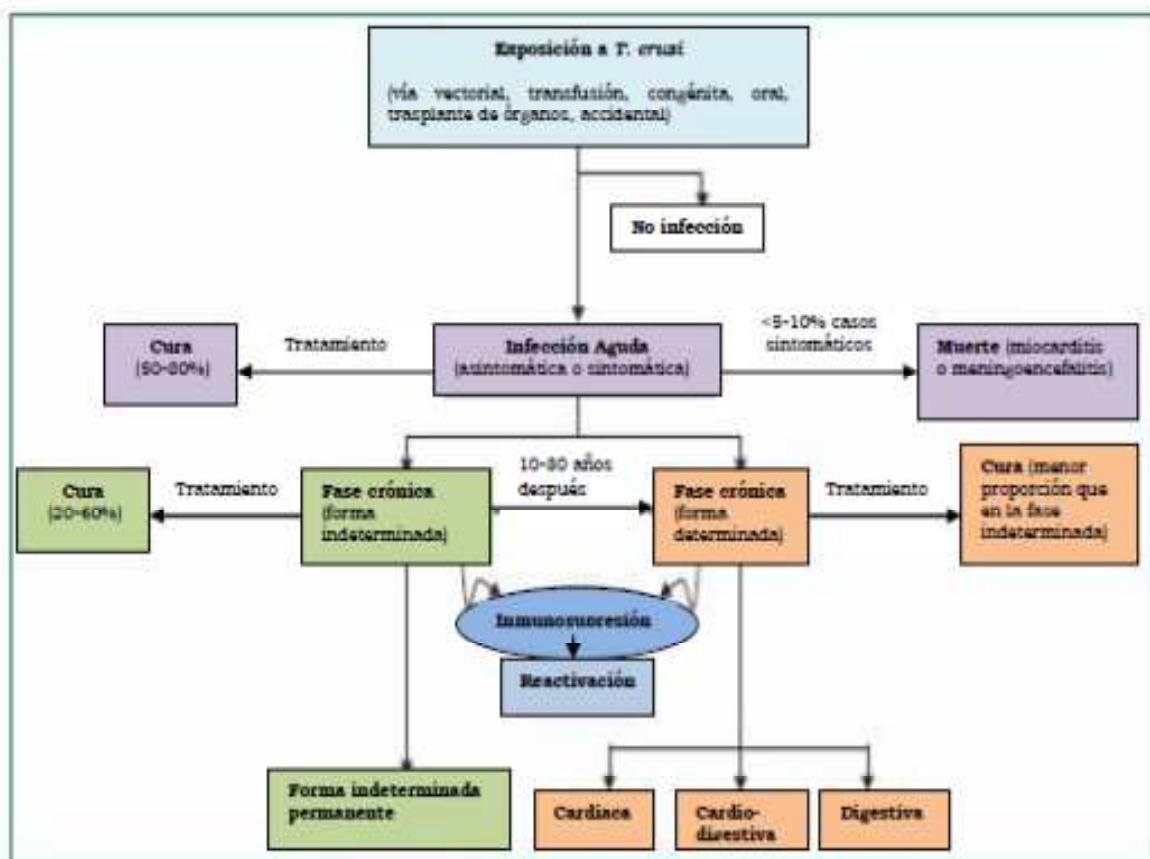


Figura 7. Historia natural de la enfermedad de Chagas.

4.2- Tratamiento

Los fármacos actualmente aceptados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche) y nifurtimox (Lampit®, Bayer Health Care) (Apt, 2010). Ambos fármacos demostraron rápidamente su efectividad en el tratamiento de las infecciones agudas, pero fueron ampliamente ignorados en el tratamiento de las infecciones crónicas debido a la elevada frecuencia de reacciones adversas, bajos índices de curación y a la falta de un consenso internacional sobre los criterios diagnósticos y parasitológicos de curación (Jannin y Villa, 2007). Ambas drogas son activas en la fase aguda, ayudando a controlar la enfermedad y disminuyendo la probabilidad de desarrollar cronicidad.

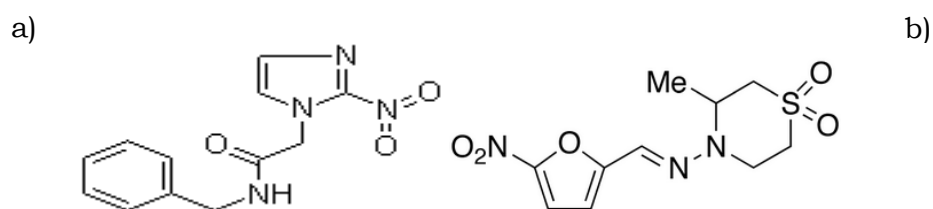


Figura 8. Representación de la fórmula química de los compuestos: a) benznidazol y b) nifurtimox

Benznidazol es un nitroimidazol (N-bencil-2-nitroimidazol acetamida) usado en terapia humana desde 1978. Inhibe la síntesis de ARN y genera acumulación de superóxidos. Con un metabolismo de eliminación mixto (70% hepático y 30% renal), su posología es de 5-7mg/kg/día durante 60 días en adultos y 5-10 mg/kg/día durante 90 días en niños. No es necesario ajuste de dosis en el caso de insuficiencia renal o hepática. Modelos animales han demostrado que es capaz de atravesar la placenta y tiene efectos teratogénicos, por lo que el benznidazol no debe administrarse en el embarazo (Castro y col., 2006). Su principal efecto secundario se caracteriza por reacciones de hipersensibilidad al principio del tratamiento (días 7-10), toxicidad medular (días 20-30) y neuropatías periféricas al final del tratamiento, normalmente después de una dosis acumulativa de 18 gramos.

Nifurtimox es un nitrofurano (5-nitrofurano 3-metil-4-(5'-nitrofur lideneamina) tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dioxido) también usado desde 1970. Su mecanismo de acción es por toxicidad en el ADN del parásito debido a la acumulación de radicales libres y superóxidos. Se metaboliza a través del hígado y su posología es de 8-10 mg/kg/días durante 90 días en adultos y 15 mg/kg/día durante 90 días en niños. Sus principales efectos adversos son manifestaciones digestivas (nauseas, vómitos, diarrea, anorexia, pérdida de peso) y manifestaciones neuropsiquiátricas (irritabilidad, alteración del sueño y neuropatías periféricas).

Un punto importante a tener en cuenta es que ambos fármacos son recomendados, pero no están totalmente validados por la medicina basada en la evidencia, y tampoco están claramente permitidos por la US Food and Drug Administration (FDA) o la Agencia Europea del Medicamento (AEM).

Actualmente se están estudiando nuevos enfoques para el tratamiento específico de esta infección, basados en el conocimiento de la bioquímica y fisiología del *T. cruzi* en los últimos años, que prometen ser más eficaces contra el parásito y tolerables para el paciente. Entre las moléculas más prometedoras se encuentran inhibidores específicos de la biosíntesis del ergosterol, concretamente nuevos derivados triazólicos que bloquean la C14 α desmetilasa de los esteroides. Los agentes más avanzados de este tipo son el posaconazol y el ravuconazol.

El Posaconazol (POS) es un triazol de amplio espectro actualmente aprobado para el tratamiento de infecciones por hongos agresivos (DOC ID 3771208, 2010). POS inhibe el ergosterol y tiene un perfil farmacocinético favorable, con una vida media prolongada y buen volumen de distribución. POS está considerado como una buena alternativa de tratamiento para erradicación del amastigote intracelular, que es el que predomina en la fase crónica de la enfermedad de Chagas (DOC ID 3771208, 2010). La concentración inhibitoria mínima de POS que es eficaz para tratar los amastigotes de *T. cruzi* es de 0,3 nM, 1000 veces menor que la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de BNZ (Urbina y col, 1998). En modelos murinos de enfermedad de Chagas crónica, POS ha demostrado que al menos es tan efectivo como el benznidazol (Molina y col., 2000), con una tasa de cura parasitaria del 60% al 75%, determinada mediante la demostración de ausencia de parásitos después del tratamiento (Urbina y col., 1998). Una publicación reciente, ha documentado un tratamiento exitoso con POS en una mujer con enfermedad de Chagas crónica que se encontraba recibiendo tratamiento inmunosupresivo para el manejo de lupus eritematoso (Pinazo y col., 2010_a).

Actualmente, se está realizando el estudio STOP-CHAGAS, que es un estudio randomizado multicéntrico, de fase II, que explora la eficacia del

POS comparado contra BNZ en pacientes en la llamada fase indeterminada de la enfermedad de Chagas sin evidencia de compromiso cardiomiopático.

El E1224 es un profármaco del ravuconazol y candidato prometedor para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, por su perfil de bioseguridad benigno, sus resultados farmacocinéticos y sus prometedores resultados tanto *in vivo* como *in vitro*.

Otros compuestos que podrían desarrollarse en la próxima década incluyen inhibidores de proteasas específicas del parásito (cruzipaina) y bifosfonatos, e inhibidores de la enzima farnesildifosfato sintetasa y/o hexoquinasa del parásito. Enfoques quimioterapéuticos más recientes incluyen inhibidores de diferentes enzimas (tripanotio reductasa, hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa, prenil-transferasa de proteína), inhibidores de la biosíntesis de fosfolípidos, e inhibidores de la biosíntesis del ergosterol que actúan a nivel de la enzima escualeno sintetasa y oxidoescualeno ciclasa.

El tratamiento con más de un agente terapéutico ha demostrado su eficacia en múltiples enfermedades infecciosas. La eficacia aumentada de los tratamientos combinados debido a efectos sinérgicos ayuda a reducir la dosis de cada uno de los fármacos, lo que disminuye la aparición de efectos adversos. Así, tratamientos combinados como nifurtimox más benznidazol, nifurtimox o benznidazol más alopurinol, nifurtimox o benznidazol más ketoconazol, fluconazol o itraconazol han mostrado resultados prometedores en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Araujo y col., 2000; Rodrigues, 2009).

5- Coinfección *Trypanosoma cruzi* con otros patógenos

5.1- *Helicobacter pylori*

El género *Helicobacter* pertenece al orden *Campylobacterales*, familia *Helicobacteriaceae* que incluye diferentes géneros (*Wolinella*, *Flexispira*, *sulfurimonas*, *Thiomicrospira* y *Thiovulum*). Hasta la fecha, el género *Helicobacter* consta de 20 especies reconocidas. Todos los miembros del

género son microaerófilos, en la mayoría de los casos catalasa y oxidasa positivo, y algunos de ellos ureasa positivos.

H. pylori es una bacteria gram negativa con un tamaño de 2-4 μm de largo y 0,5-1 μm de ancho. Aunque normalmente tiene forma espiral, puede aparecer como bacilo o coco tras tratamiento antibiótico o cultivo prolongado (Kusters y col., 1999). Posee de 2 a 6 flagelos unipolares que le confieren movilidad, y le permiten moverse con rapidez en soluciones viscosas como la capa mucosa que cubre las células epiteliales gástricas (O'Toole y col., 2000).

Desde 1984, año en el que se aisló por primera vez este microorganismo en cultivo (Marshall y Warren, 1984), se ha recogido una gran cantidad de información acerca de la prevalencia de *H. pylori*. Las tasas más altas de portadores se encuentran en los países en vías de desarrollo, donde el 70-90% de la población está colonizada, la mayoría antes de los diez años (Perez-Perez y col., 2004).

A diferencia de esta situación, en países desarrollados como EEUU, se ha observado que la incidencia de colonización por *H. pylori* en individuos sanos es relativamente baja durante la infancia, pero aumenta hasta alrededor del 40% en los adultos (Pounder, 1995). Dentro de las áreas geográficas, la prevalencia está inversamente relacionada con el estatus socioeconómico, en particular con las condiciones de vida durante la infancia (Malaty y Graham, 1994). Estos estudios también han demostrado que del 70 al 100% de los pacientes con gastritis, úlceras gástricas y úlceras duodenales están infectado por *H. pylori*. Se cree que la colonización persiste durante toda la vida del individuo, salvo que este reciba tratamiento específico.

La colonización por *H. pylori* determina de forma invariable datos histológicos de gastritis, es decir, infiltración por neutrófilos y células mononucleares en la mucosa gástrica. La fase aguda de la gastritis se caracteriza por una sensación de plenitud, náuseas, vómitos e hipoclorhidria. Esto puede evolucionar a gastritis crónica, en la que la enfermedad se limita al antro gástrico en pacientes con una secreción

normal, o afecta a todo el estómago cuando se suprime la secreción ácida. Un 10-15% de los pacientes con gastritis crónica desarrollarán úlceras pépticas.

La gastritis crónica acaba sustituyendo la mucosa gástrica normal por fibrosis con proliferación de un epitelio de tipo intestinal. Este proceso aumenta el riesgo de sufrir un carcinoma gástrico casi cien veces. Este riesgo viene condicionado por la cepa de *H. pylori* y la respuesta del anfitrión (cepas *cagA* positivas y elevada producción de IL-1 se asocian a un mayor riesgo de cáncer).

Las infecciones por *H. pylori* se asocian también a infiltración por tejido linfóide de la mucosa gástrica. En un número de pacientes pequeño, se puede producir una población monoclonal de linfocitos B que evolucionan a un linfoma MALT.

H. pylori, también se ha relacionado con una variedad de patologías extradigestivas; entre ellas las más estudiadas son las enfermedades dermatológicas (rosácea y urticaria crónica) y el aumento del riesgo de enfermedad coronaria en el adulto. Son numerosos los estudios que se han realizado con la finalidad de intentar demostrar la relación causa-efecto entre la infección de *H. pylori* y la enfermedad isquémica coronaria.

Aunque son muchos los trabajos realizados, sobre todo los que analizan la relación seroepidemiológica entre la infección por *H. pylori* y la enfermedad coronaria, fueron Mendall y colaboradores (1994) los primeros en publicar un estudio en el que demostraron que los pacientes con una patología isquémica cardíaca presentaban un título serológico de anticuerpos frente a *H. pylori* mayor que los sujetos control. Posteriormente, se publicó un nuevo estudio (Patel y col., 1995) en el que se reafirmaba esta asociación. Así mismo, se sugiere que esta asociación podría ser explicada por los efectos a largo plazo del proceso inflamatorio, lo que incluye un incremento en los niveles de fibrinógeno, proteína C reactiva, ácido siálico y otras proteínas de fase aguda.

Antes del descubrimiento de *H. pylori*, la gastritis crónica que encontramos comúnmente en los pacientes con enfermedad de Chagas, sobre todo en aquellos con formas digestivas, había sido atribuida formalmente al reflujo gástrico-duodenal, así como a la hipomotilidad e hipoclorhidria, que como resultado de la infección por *T. cruzi* producía un daño en el sistema nervioso entérico (Troncon y col., 1984; Rezende y col., 1985; Romanello y col., 1991; Oliveira y col., 1998).

Posteriormente, algunos estudios demostraron una alta prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes con enfermedad de Chagas (Barbosa y col., 1993; Oliveira y col., 1997; Nascimento y col., 2002; Pinazo y col., 2010_b)

5.2- Helmintos

5.2.1- Geohelminthos y *Schistosoma*

La prevalencia e intensidad de las infestaciones producidas por geohelminthos y *Schistosoma*, con su profundo impacto sobre la salud y desarrollo humano, continúan siendo elevadas. Se estima que más de 2.000 millones de personas, aproximadamente la tercera parte de la población mundial, están infestadas por uno o más de estos parásitos (Tabla 4). De éstas, cerca de 300 millones sufren formas clínicas graves, y unas 155.000 mueren cada año por causas atribuibles a estas parasitosis (Crompton, 1999).

Tabla 4. Estimaciones de la prevalencia de infestación, morbilidad y mortalidad mundial causadas por geohelminthos y *Schistosoma*.

Parásitos	Prevalencia (millones)	Morbilidad (millones)	Mortalidad
<i>Ascaris lumbricoides</i>	1450	350	60.000
Uncinarias	1300	150	65.000
<i>Trichuris trichiura</i>	1050	220	10.000
<i>Schistosoma</i>	200	20	20.000

Fuente: adaptado de Crompton, 1999

Partiendo de estas cifras, se ha considerado que las geohelmintosis y las esquistosomosis representan más del 40% de la carga mundial correspondiente a las enfermedades tropicales, excluyendo la malaria o paludismo (OMS, 1999).

Las infestaciones producidas por geohelminthos están presentes en prácticamente todas las zonas tropicales y subtropicales del planeta, en especial en las áreas de mayor atraso socioeconómico (por ejemplo, la mayor parte de los países africanos subsaharianos y las poblaciones indígenas, así como los asentamientos periurbanos de extrema pobreza en América).

Las infestaciones producidas por geohelminthos están presentes en prácticamente todas las zonas tropicales y subtropicales del planeta, en especial en las áreas de mayor atraso socioeconómico (por ejemplo, la mayor parte de los países africanos subsaharianos y las poblaciones indígenas, así como los asentamientos periurbanos de extrema pobreza en América).

Las infestaciones producidas por *Schistosoma*, aunque también encuentran su nicho en poblaciones postergadas, se presentan en forma más focalizada, según las condiciones ambientales y la distribución geográfica de las especies del parásito y de sus vectores donde completan parte de sus ciclos de vida. Se estima que alrededor del 30% de la población de América Latina está infestada por geohelminthos (OPS, 1998). Sin embargo, esta prevalencia no es homogénea. Los estudios realizados, relativamente escasos, evidencian cifras de prevalencia muy diferentes entre países, incluso, entre zonas de un mismo país. Ello está en relación con factores climáticos (menor prevalencia en países y zonas más alejadas del trópico) y, sobre todo, con factores socioeconómicos (mayor prevalencia en países y zonas de mayor pobreza).

En relación con las esquistosomosis, uno de los principales problemas de América Latina es la falta de información fiable. Por los datos hoy disponibles, ocho países son endémicos de infestación por *Schistosoma*: Brasil, Venezuela, Surinam y Guyana, en la parte

continental; República Dominicana, Puerto Rico, Martinica y Santa Lucía, en el Caribe.

Entre los cientos de especies de helmintos que infestan al hombre, sólo los geohelmintos y *Schistosoma mansoni* son causas de problemas de salud en América.

5.2.2-Nematodos: *Trichinella spiralis*

Los gusanos nematodos del género *Trichinella* constituyen uno de los patógenos zoonóticos más extendidos en todo el mundo. La infección por *Trichinella* spp. se ha visto en animales domésticos y/o salvajes de todos los continentes, a excepción de la Antártida, donde no se ha informado sobre la existencia de este parásito (Pozio y Murrell, 2006). La distribución global del parásito, junto con los diferentes hábitos culturales alimenticios, representan el principal factor que favorece la infección en el hombre, tanto en países industrializados como no industrializados (Murrell y Pozio, 2000; Bolpe y Boffi, 2001).

La enfermedad (triquinosis) afecta a los animales salvajes y domésticos, y puede ser transmitida al hombre por la ingestión de carne cruda o mal cocida de animales que contienen larvas infestadas viables, en particular carne de cerdo. Hasta hace poco, todas las infecciones producidas por *Trichinella* en animales y hombre eran atribuidas a *Trichinella spiralis*. Hoy en día se reconocen ocho especies (*T. spiralis*, *Trichinella nativa*, *Trichinella britovi*, *Trichinella pseudospiralis*, *Trichinella murrelli*, *Trichinella nelsoni*, *Trichinella papuae*, y *Trichinella zimbabwensis*) y tres genotipos (*Trichinella* T6, T8 and T9) (Pozio y Murrell, 2006; Zarlenga y col., 2006).

En la actualidad, la especie huésped no parece ser importante para distinguir las especies de *Trichinella*. Además, en la mayoría de los casos la variedad del reservorio animal refleja solamente la fauna presente en las distintas áreas geográficas.

La infección produce enfermedad en el hombre en un porcentaje pequeño de los casos, y se relaciona con la ingestión de una gran cantidad

de larvas y con la patogenicidad de la cepa. La invasión de la pared intestinal por los parásitos hembras, fundamentalmente del duodeno y el yeyuno, origina una inflamación transitoria que puede producir diarrea y dolor abdominal, semejantes a los asociados con muchas otras infecciones intestinales. La letalidad por triquinosis es menor del 1%, y obedece a complicaciones secundarias graves ocasionadas por la localización encefálica, cardíaca o diafragmática de las larvas (Capo y Despommier, 1996).

Aunque en los países de América Latina, Asia y África se han realizado pocas investigaciones para confirmar su presencia, es probable que *Trichinella* esté diseminada en todo el mundo.

En países como Chile y Argentina, donde ocurren periódicamente brotes epidémicos de triquinosis, la enfermedad tiene una prevalencia de 2 a 5% y constituye un importante problema de salud pública (Zamorano y col., 1991; López y col., 1992). Por lo que se refiere a Bolivia, hasta 1993 se consideraba que la infección no existía en el país.

6- Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas

En general, el diagnóstico de una enfermedad infecciosa se apoya en informaciones epidemiológicas, clínicas y de laboratorio. En el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* se aplican los mismos principios (Ferreira y Ávila, 1996).

En lo referente a los antecedentes epidemiológicos, es importante conocer no sólo la procedencia del enfermo, sino también la existencia de hermanos, padres u otros familiares con la infección. En aquellas zonas donde hay constancia de la existencia de triatominos, se puede sospechar de la presencia de la infección. Otros aspectos a considerar serían el tipo de vivienda o el recordar haber sufrido una picadura.

Los datos clínicos sólo van a ser útiles en la fase crónica sintomática, en particular cuando exista un bloqueo completo de rama derecha del haz de His en el electrocardiograma, que en países como Brasil

tiene un valor predictivo superior al 95%, o el megaesófago (superior al 90%) o megacolon (superior al 98%). En los asintomáticos en fase crónica (forma indeterminada) la información clínica tiene poco valor.

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas reviste unas características especiales debido a que, según la etapa en la que se encuentre el paciente se utilizará técnicas de búsqueda del parásito, o bien técnicas de detección de parásitos.

La primera fase de la enfermedad, la fase aguda, se caracteriza por una parasitemia elevada, detectable por medios parasitológicos directos. Esta fase puede durar de 2 a 8 semanas. La parasitemia desciende paulatinamente, y se instaura la fase crónica (asintomática o sintomática), fase en la cual la parasitemia persiste pero es difícilmente detectable. En esta fase hay una elevada producción de anticuerpos específicos de tipo IgG que son fácilmente detectables por técnicas serológicas. Estos anticuerpos, en la mayoría de los pacientes estarán presentes durante toda la vida (Figura 9).

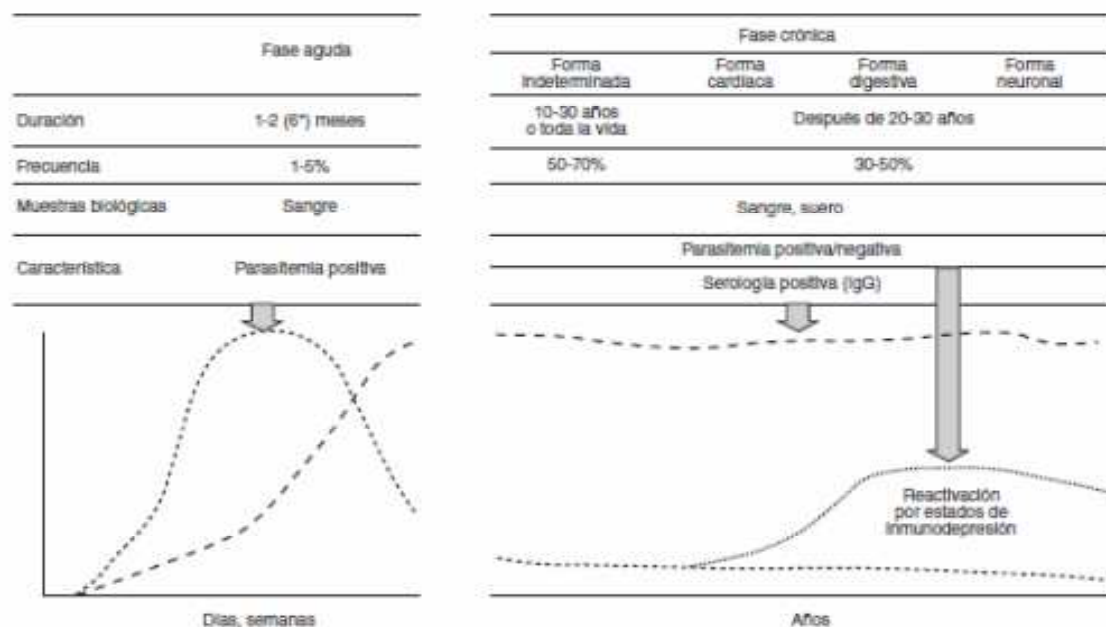


Figura 9. Relación de la dinámica de la parasitemia (línea de puntos) y los anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* (línea discontinua) en la infección por *T. cruzi*.

6.1- Diagnóstico parasitológico

Durante la fase aguda de la enfermedad existen numerosos parásitos en sangre periférica, y es posible detectarlos mediante pruebas parasitológicas directas (Tabla 4).

La observación mediante microscopía de sangre periférica en fresco entre portaobjeto y cubreobjeto, permite distinguir fácilmente la presencia del parásito debido a sus rápidos movimientos entre las células sanguíneas. Una vez visualizado el parásito se confirma el diagnóstico, sin necesidad de practicar otros exámenes (Luquetti y Rassi, 2000).

Las extensiones de sangre periférica y la gota gruesa, adecuadamente teñidas, permiten observar las características morfológicas del parásito. Cuando el nivel de parasitemia es bajo, sin embargo, es necesario usar técnicas de concentración, como son el método de Strout (Strout, 1962) o el microhematocrito (Freilij y col., 1983).

Con el examen en fresco se logra detectar parásitos en el 85% de los casos en fase aguda. Con los métodos de concentración, ese porcentaje se eleva a más del 95%, siempre que no hayan transcurrido más de 30 días desde el inicio de los síntomas (Luquetti y Rassi, 2000).

La detección de antígenos en orina y suero, mediante ensayos de captura en formato ELISA, han sido descritos para el diagnóstico de la infección aguda y congénita (Freilij y col., 1987) e incluso en casos crónicos. Sin embargo, no se han desarrollado más avances con esta metodología.

El xenodiagnóstico y el hemocultivo (disponibles sólo en laboratorios especializados) son métodos clásicos, cuya sensibilidad depende del grado de parasitemia del paciente. En la actualidad se dispone de un xenodiagnóstico artificial que se puede recomendar en lugar del xenodiagnóstico habitual, ya que la sensibilidad es la misma que con el xenodiagnóstico tradicional y se evita la exposición directa del paciente al triatomino. Ambos métodos, además de su interés diagnóstico, son

herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones.

Otra opción para la detección de *T. cruzi* es la inoculación en ratones que, aunque se emplea fundamentalmente en investigación (Mortatti y col., 1992), se utilizó con éxito en el diagnóstico de casos agudos (Añez y col., 1999), y también en pacientes crónicos coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Braz y col., 2001).

En los últimos años, la detección de ADN mediante PCR se ha convertido en una alternativa; aunque su realización requiere un tiempo superior al empleado en la observación directa, es inferior al necesario para detección de la presencia del parásito mediante xenodiagnóstico y hemocultivo. Existen numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*; en la Tabla 5 se resumen las aproximaciones más representativas que se han abordado con el fin de estandarizar la técnica (Schijman y col., 2011).

Tabla 5. Dianas de diagnóstico molecular de *Trypanosoma cruzi*.

Diana	Iniciadores	Tamaño del amplificado
Minicírculo ADNk	121-122	330pb
	S35-S36	330pb
	32f-148r	118pb
Miniexón	TC1-TC2	350pb
ADN satélite	Tcz1-Tcz2	195pb
	TczF-TczR	182pb
	cruzi1-2	111, 195pb
24s α-ARNr	D71-D72	110, 125pb
18 SSU-ARNr	Tc18s F3-R4	165pb
SL-ADN	Tcc-Tc1-Tc2	300; 350pb
CO II-ADN	Tcmit 31-40	290pb
	Nested Tcmit 10-21	375pb

En diagnóstico, las dianas más utilizadas son el minicírculo del ADNk (Wincker y col., 1994) y la secuencia repetida de ADN satélite (Moser y col., 1989). Como ambas se encuentran representadas en un número de copias muy similar (10^4 copias), las diferencias en el límite de detección dependen de la optimización de cada reacción. En zonas endémicas, la PCR desde el punto de vista diagnóstico sólo se emplea en estudios de investigación. En los países no endémicos, la PCR es una herramienta que se emplea en determinadas situaciones, como por ejemplo en el seguimiento de una sospecha de infección por transfusión sanguínea o trasplante, la reactivación de una infección crónica tras un trasplante, en el diagnóstico y confirmación de un Chagas congénito, y en el seguimiento de una infección accidental. En la fase crónica, la PCR, es además, una prueba complementaria, y tiene utilidad como criterio parasitológico de cura en el seguimiento del tratamiento (Murcia y col., 2010).

La PCR cuantitativa en tiempo real todavía no está muy introducida en el diagnóstico habitual, debido a que la determinación de la carga parasitaria es útil, principalmente, en la etapa aguda y en el seguimiento de infecciones experimentales. Su utilización en el diagnóstico de la infección crónica tiene las mismas limitaciones que una PCR tradicional. Además, los parásitos no están siempre presentes en cada mililitro de la muestra de sangre (Carlier y col., 2003). No obstante, mediante esta metodología se reduce el tiempo de visualización de los productos de amplificación.

Tabla 6. Técnicas de diagnóstico empleadas en la infección por *Trypanosoma cruzi*.

Infeción aguda	Infeción crónica
Diagnóstico parasitológico	
Observación en fresco (400x)	Microhematocrito
Extensiones teñidas	Xenodiagnóstico
Gota gruesa	Cultivo de sangre
Microhematocrito	PCR
Strout	
Xenodiagnóstico	
Cultivo de sangre	
Inoculación en ratones	
PCR	
Diagnóstico serológico	
ELISA	ELISA
IFI	IFI
HAI	HAI
	Western blot
	RIPA
	Inmunocromatografía
	Aglutinación

6.2- Diagnóstico serológico

T. cruzi es un protozoo extremadamente antigénico, por lo que pocos meses después de la infección se espera que exista una respuesta inmune humoral eficaz para controlar el aumento de la parasitemia. Normalmente, esto se consigue por medio de anticuerpos producidos contra diferentes componentes del parásito, fundamentalmente de tipo IgG (IgG1-IgG3), aunque también podemos encontrar en un 5-10% de los casos IgM y en menor proporción IgA.

El diagnóstico serológico se basa en la determinación de inmunoglobulinas G totales anti-*T.cruzi* (Tabla 6). Por cuestiones prácticas, se denomina convencional cuando se emplea como antígeno todo

el parásito (Inmunofluorescencia indirecta [IFI]) o una mezcla compleja de antígenos de parásito (hemoaglutinación indirecta [HAI] y ensayos inmunoenzimáticos [ELISA]). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos (OMS, 2003).

A pesar de los continuos avances, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, por tanto el diagnóstico serológico de certeza se basa en la concordancia de, al menos, dos técnicas de distinto principio y antígeno diferente (OMS, 2003). Cuando los resultados son discordantes, es necesario realizar otras pruebas de confirmación, y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden producir reacciones falsamente positivas (leishmaniasis, malaria, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis, enfermedades autoinmunes,...).

6.2.1- Diagnóstico serológico convencional

La detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* ha sido y es el principal método para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Los anticuerpos son detectado por diferentes test comerciales disponibles; entre ellos los más empleados son: la hemaglutinación indirecta (HAI), inmunofluorescencia indirecta (IFI), y ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Antigüamente se utilizaba el test de fijación de complemento (Guerreiro y Machado, 1913), así como la aglutinación directa con 2-Mercaptoetanol (Peralta y col., 1981), ambos en desuso. Los antígenos empleados en estos test son fracciones antigénicas totales o semi-purificadas de las formas epimastigotes de *T. cruzi* dando lugar a un aumento de las reacciones inespecíficas (falsos positivos) y una sensibilidad bastante alejada de lo ideal.

Se ha descrito variabilidad en la reproducibilidad y exactitud de los resultados de estos test convencionales, lo que podría ser explicado por la poca estandarización de los reactivos (Camargo y col., 1986).

Así mismo, también es frecuente encontrar reacciones cruzadas con anticuerpos producidos por otros patógenos, por ejemplo, en individuos

infectados con *Leishmania* spp (Chiller y col., 1990) o *Trypanosoma rangeli* (Guhl y col., 1987). Incluso algunos pacientes con enfermedad de Chagas pueden dar resultados negativos con la serología clásica (Luquetti, 1987). Este escenario claramente indica la necesidad de desarrollar mejores test diagnósticos para la enfermedad de Chagas (Moncayo y Luquetti, 1990).

6.2.2-Diagnóstico serológico no convencional

Las pruebas serológicas no convencionales se basan, fundamentalmente, en técnicas ELISA que utilizan como reactivos proteínas recombinantes, antígenos purificados o péptidos sintéticos, creados con el fin de aumentar la especificidad del diagnóstico serológico y evitar la reactividad cruzada con otras enfermedades parasitarias como la leishmaniasis.

En estos métodos serológicos, se ha propuesto la utilización de nuevos soportes para inmovilizar los antígenos, tales como tiras o cuentas de colores, y de nuevas técnicas como la inmunoelectrotransferencia (Western blot).

Las pruebas que se emplean con más frecuencia son las que utilizan antígenos recombinantes. Aunque la mayoría de las pruebas no convencionales poseen gran especificidad, su sensibilidad puede ser inferior a la de la serología convencional.

Todos los trabajos publicados hasta la fecha coinciden en la gran complejidad antigénica de *T. cruzi*, existiendo una gran heterogeneidad a nivel de antígenos entre cepas, clones (Alves y col., 1987) e incluso entre las distintas formas que adopta en su ciclo de vida (Rangel-Aldao y col., 1986). La interacción e internalización del parásito en la célula hospedadora son fenómenos multifactoriales y no bien conocidos, en los que resulta esencial el establecimiento de estrechas interacciones entre las membranas de ambas células.

En diferentes protozoos patógenos, se ha observado antígenos proteicos que muestran con frecuencia secuencias inmunodominantes que se repiten en tándem (Schofield, 1991). No es mucho lo que se conoce

sobre el mecanismo molecular que se encuentra bajo la inmunodominancia de estas secuencias repetidas, excepto por su multivalencia, que puede hacerles activar directamente los linfocitos B y comportarse como antígenos T independientes (Schofield, 1991). Sin embargo, existen evidencias de que la conformación del epítipo puede ser relevante en la unión antígeno-anticuerpo.

En *T. cruzi* existe un número importante de proteínas que contienen dominios repetidos en tándem que han mostrado tener relevancia inmunológica, dado que la mayoría de ellos son moléculas antigénicas (Goto y col., 2008). Los antígenos que llevan estas secuencias repetidas parecen poseer un importante grado de antigenicidad y son diana de la respuesta de los linfocitos B.

El clonaje y secuenciación de antígenos inmuno-dominantes de *T. cruzi* en las infecciones en el hombre, ha abierto nuevas posibilidades para la elaboración de reactivos de diagnóstico bien definidos en forma de antígenos recombinantes o péptidos sintéticos. La evaluación de algunas proteínas recombinantes ha mostrado resultados prometedores para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (Umezawa y col., 1999; da Silveira y col., 2001).

La tendencia actual es emplear proteínas recombinantes como elementos sensibilizantes, ya que se pueden obtener grandes cantidades de ellas altamente purificadas, y además pueden ser sintetizadas a partir de secuencias de ADN que codifican para fragmentos del péptido en el cual se han eliminado las regiones responsables de las reacciones cruzadas (da Silveira y col., 2001; Aguirre y col., 2006). Además, determinados péptidos recombinantes se han usado en el diagnóstico serológico, basándose en su capacidad de mejorar diferentes aspectos de los test, comparados con los que emplean extracto total del parásito (Umezawa y col., 2004; Levin y col., 1991).

Teniendo en cuenta la pérdida de sensibilidad que se produce al usar un único péptido recombinante, varios autores que han evaluado la utilización de antígenos recombinantes en ensayos separados, han

sugerido que una mezcla de estos péptidos podría obtener una sensibilidad similar a la suma de las individuales (Krieger y col., 1992; Levin y col., 1991). Considerando esta cuestión, se han empleado diferentes péptidos, mejorando de diferentes maneras la realización del ensayo (Ameida y col., 1990).

Alternativamente, también se ha propuesto como estrategia para aumentar la sensibilidad, el uso de proteínas con múltiples epítopes que expresan diversos determinantes antigénicos no relacionados (Houghton y col., 2000). Un argumento que afianza el uso de moléculas quiméricas en lugar de diferentes epítopes expresados por separado, es que una única molécula facilita la estandarización del proceso por una disminución de la purificación de las moléculas, de los pasos de inmovilización y por equilibrar el número de epítopes en la superficie de la microplaca del inmunoensayo (Anandarao y col., 2005).

La tecnología del ADN recombinante para obtener moléculas híbridas se ha usado ampliamente en la obtención de inmunógenos para la elaboración de vacunas, pero sólo un pequeño número de autores han aprovechado este enfoque para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*.

6.3- Procedimientos diagnósticos de la enfermedad de Chagas

En el diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi*, es necesario distinguir diferentes contextos y según estos adoptar diferentes procedimientos (Tabla 7):

- Confirmación de sospecha clínica: en este caso deberíamos utilizar test con alta especificidad para evitar falsos positivos; se deberían realizar dos test convencionales. Si el resultado entre ambas técnicas es discordante, se realizará un tercer test, convencional o no convencional.
- Cribado en bancos de sangre: en estas muestras para aumentar la seguridad de la donación, se emplearían test con alta sensibilidad; se recomienda realizar un ELISA.

- Transmisión congénita: se realizaría un test convencional a la madre, y en caso de resultado positivo se confirmaría con otro test convencional. En niños de madres seropositivas, se debería realizar un test convencional (determinación de IgG) a los 8 meses tras el nacimiento. Los test parasitológicos son deseables siempre que sea posible realizarlos.

- Estudios epidemiológicos: en este caso necesitaríamos un test con alta sensibilidad; se empleará un único test convencional, pudiéndose emplear suero, plasma o sangre recogida en papel de filtro.

- Seguimiento del tratamiento: es necesario comparar con las muestras de suero tomadas antes de iniciar el tratamiento para observar la disminución del título de anticuerpos que nos indicará curación; se recomienda dos test serológicos. En aquellos centros en los que esté disponible, se puede realizar una PCR para verificar la eliminación de la parasitemia.

Tabla 7. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas.

	Métodos serológicos y moleculares				
	Convencional			No convencional	
	ELISA	IFI	HAI	Ag recombinantes	PCR
Evidencia serológica (2 tests recomendados)	X	X	X	X	
Cribado banco de sangre (1 test recomendado)	X				
Transmisión congénita (2 tests recomendados)	X	X		X	X
Estudios epidemiológicos (1 test recomendado)	X	X			
Seguimiento tratamiento (2 tests recomendados)	X	X	X		X

Fuente: OMS, 2002

La única forma de garantizar que los resultados del diagnóstico serológico sean correctos es seguir las buenas prácticas de laboratorio (BPL), incluido la aplicación de controles de calidad y la evaluación periódica del trabajo del laboratorio, junto con una legislación que obligue evaluar los reactivos antes de comercializarlos.

II. OBJETIVOS

Los recientes flujos migratorios han acaecido la llegada de un número importante de personas procedentes de zonas donde la enfermedad de Chagas es endémica. En el año 2007, se inició la actividad de la Unidad de Medicina Tropical, lo que ha permitido diagnosticar a un gran número de pacientes con dicha enfermedad, siendo la región de Murcia uno de los mayores focos de enfermedad de Chagas en zona no endémica.

El diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas reviste unas características especiales debido a que, según la fase en la evolución de la enfermedad en la que se encuentre el paciente, se utilizarán distintas técnicas de detección del parásito. Así, la detección de anticuerpos frente a *Trypanosoma cruzi* ha sido y es el principal método para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. No obstante, a pesar de los continuos avances, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad; además, es frecuente encontrar reacciones cruzadas con anticuerpos producidos por otros patógenos.

El objetivo principal de esta tesis es evaluar, en el contexto epidemiológico de la Región de Murcia, la eficacia de las herramientas disponibles para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Este objetivo general se concreta en los siguientes objetivos específicos:

- Evaluar las diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico y serológico (convencionales y no convencionales) en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica.
- Ensayar nuevas técnicas de diagnóstico serológico para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi*.
- Valorar la utilidad del péptido sintético 3973 como herramienta diagnóstica en la identificación de pacientes con infección crónica por *T. cruzi*, y analizar los cambios en la respuesta antígeno-específica tras el tratamiento con benznidazol.
- Determinar la prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con y sin enfermedad de Chagas procedentes de zona

endémica de dicha enfermedad, y estudiar la prevalencia de co-infección con otros parásitos endémicos y su posible influencia en el diagnóstico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1- Pacientes y muestras clínicas

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

El HUVA es un hospital de tercer nivel con 863 camas, que da servicio al Área de Salud I (Murcia/Oeste) con una población de más de 500.000 habitantes. Además, constituye el hospital de referencia de la Región de Murcia.

Las muestras fueron analizadas siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2001) para el diagnóstico de enfermedad de Chagas, con 2 técnicas serológicas de principio antigénico diferente. Como test de referencia utilizamos un ELISA (*T. cruzi* ELISA test system; Ortho Clinical Diagnostic, USA) que emplea extracto total del parásito como antígeno, e IFI (Inmunofluor CHAGAS kit; Biocientífica S.A., Buenos Aires) que usa formas epimastigotes de *T. cruzi*.

El paciente se consideró que estaba infectado, cuando entre los resultados obtenidos con la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ELISA convencional existía concordancia, así como compatibilidad con la información clínico-epidemiológica.

Se analizaron un total de 338 muestras de suero pertenecientes a diferentes pacientes (Tabla 8). De estas, 165 muestras procedían de la rutina asistencial y por tanto, el origen geográfico de los pacientes fue desconocido; 157 muestras provenían de pacientes procedentes de Latinoamérica, 107 diagnosticados de infección en fase crónica por *T. cruzi* y 50 pacientes con serología negativa frente al parásito.

Estos 157 pacientes presentaban las siguientes características demográficas: el 96,8% de la población estudiada eran de origen boliviano, mientras que el 3,2% restante correspondía a pacientes procedentes de Brasil (1 paciente), Ecuador (2 pacientes) y Paraguay (2 pacientes).

El 67,8% de los pacientes naturales de Bolivia, procedían de la Zona Subandina, principalmente de Cochabamba (89,8%), y en menor medida de Sucre, Chuquisaca y Taviya; mientras que el 32,2% era proveniente de la Zona de los Llanos, en concreto de Santa Cruz (Figura 10).

El 67% de los pacientes fueron mujeres, con una edad media de 32,5 años (rango de edad: 9-75 años). La mayoría de los pacientes fueron adultos, sólo 5 pacientes fueron niños (<14 años).

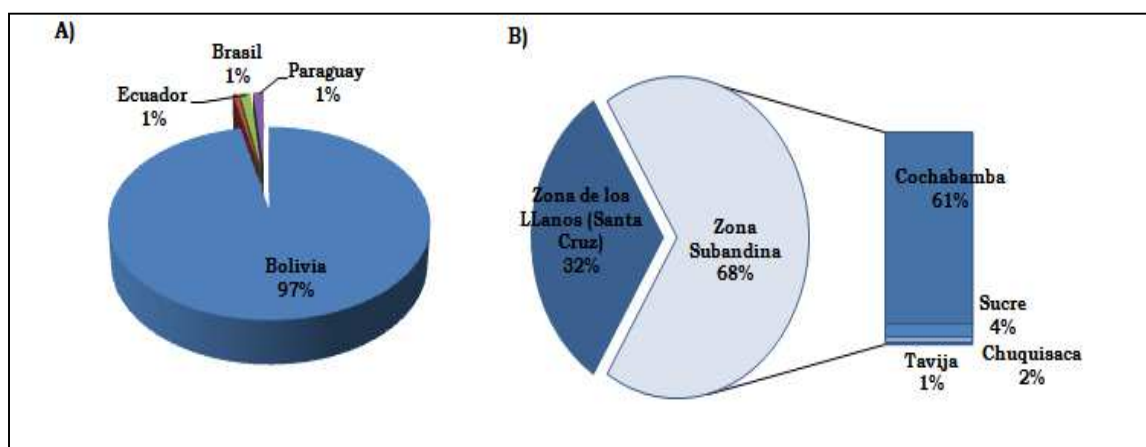


Figura 10. Origen geográfico de los pacientes que participaron en el estudio. **A)** País latinoamericano de origen **B)** Departamentos de la República de Bolivia de procedencia.

Además, se estudiaron 16 muestras de sueros pertenecientes a individuos no latinoamericanos, con evidencia serológica de estar o haber sido infectados por *Leishmania* (n: 4), *Plasmodium* (n: 10), virus del dengue (n: 1) o *Schistosoma* (n: 1). Ninguno de los pacientes tenía antecedentes de viajes a Latinoamérica.

Todos los sueros estuvieron conservados a -20°C hasta su uso.

Tabla 8. Resumen del número y origen de los pacientes incluidos en cada uno de los estudios realizados en el presente trabajo

Estudio realizado	Nº de pacientes	Origen del paciente
1. Valoración/comparación entre las técnicas de diagnóstico parasitológico y serológico	107	Pacientes de origen Latinoamericano con infección crónica por <i>T. cruzi</i>
	50	Pacientes de origen Latinoamericano sin infección por <i>T. cruzi</i>
	16	Pacientes no latinoamericanos con infección diferente a <i>T. cruzi</i>
2. Evaluación de un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)	165	Desconocido
3. Estudio del reconocimiento del péptido sintético 3973	66	Cohorte de pacientes de origen Latinoamericano con infección crónica por <i>T. cruzi</i>
	20	Pacientes de origen Latinoamericano sin infección por <i>T. cruzi</i>
	14	Pacientes no latinoamericanos con infección diferente a <i>T. cruzi</i>
4. Estudio de co-infección <i>T. cruzi</i> con otros patógenos	66	= pacientes Estudio 3
	20	= pacientes Estudio 3

1.1-Muestras empleadas en el estudio de la valoración/comparación entre las técnicas de diagnóstico parasitológico y serológico

Un total de 173 muestras de suero se utilizaron en la valoración/comparación de diferentes técnicas de diagnóstico parasitológico y serológico de la enfermedad de Chagas.

De estas, 107 muestras eran de pacientes latinoamericanos con infección crónica por *T. cruzi*, 50 de pacientes sanos procedentes de Latinoamérica y 16 muestras de individuos no latinoamericanos con anticuerpos frente a diferentes enfermedades infecciosas (ver apartado 1).

Además, en 105 pacientes con infección crónica por *T. cruzi*, se obtuvieron muestras de sangre total para las técnicas de diagnóstico parasitológico descritas posteriormente (PCR y hemocultivo).

1.2- Muestras empleadas en la evaluación de un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)

Para la evaluación del inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA), se seleccionaron de forma aleatoria 165 muestras de suero procedentes de la rutina asistencial.

Las muestras fueron consideradas positivas cuando las 2 pruebas de referencia fueron positivas; negativas si los 2 test dieron un resultado negativo, e indeterminadas cuando no cumplían ninguno de los criterios anteriores. En este último caso, las muestras discordantes fueron además testadas con la técnica inmunocromatográfica Onsite Chagas Ab Combo-Cassete (CTK Biotech, Inc. USA) y mediante detección por PCR de la región variable de 330 pares de bases (pb) del minicírculo del ADNk de *T. cruzi*. La interpretación final se realizó según el resultado concordante de 2 de las 3 técnicas.

1.3- Muestras empleadas en el estudio del reconocimiento del péptido sintético 3973

Se seleccionó una cohorte de 66 pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas en fase crónica de las muestras empleadas en el apartado 1.1. Se obtuvieron muestras de suero de los mismos antes y tras dos años de haber recibido tratamiento con benznidazol (5 mg/kg/día durante 60 días).

Para determinar el estadio clínico de la enfermedad en estos pacientes, se consideraron las siguientes manifestaciones clínicas: disnea de esfuerzo o reposo, disnea paroxística nocturna, ortopnea, edema de miembros inferiores, disfagia, reflujo gastroesofágico y estreñimiento.

Para definir los grupos clínicos, a cada paciente se le realizó una radiografía de tórax, electrocardiograma (ECG) y ecocardiograma para el estudio de la función cardíaca, y tránsito esofagogastroduodenal y enema opaco para determinar la función digestiva. Los pacientes con sintomatología cardíaca se estratificaron en base a la clasificación propuesta por Kuschnir y colaboradores (1985).

En base a las pruebas clínicas y analíticas, los pacientes fueron clasificados en 4 grupos:

- Chagas crónico asintomático (IND, n: 36); cuando la serología del paciente fue positiva y no hubo evidencia de alteraciones cardíacas ni digestivas, según criterio clínico y analítico.
- Chagas crónico cardíaco (CCC, n: 20); cuando el paciente presentaba únicamente alteraciones cardíacas, según criterios clínicos y radiológicos.
- Chagas crónico cardíaco-digestivo (CCCDIG, n: 6); cuando el paciente presentaba ambas manifestaciones.
- Chagas crónico digestivo (DIG, n: 4); cuando el paciente presentaba únicamente manifestaciones digestivas.

Además, se incluyeron 20 muestras de sueros de individuos sanos (pacientes con serología negativa) y 14 muestras de sueros de pacientes que habían sufrido alguna enfermedad infecciosas diferente a la enfermedad de Chagas (*Leishmania*, n: 4; malaria, n: 8; dengue, n: 1; *Schistosoma*, n: 1), previamente empleados en el estudio del apartado 1.1.

1.4- Muestras empleadas en el estudio de coinfección *Trypanosoma cruzi* con otros patógenos

Para determinar la posible coinfección con otros patógenos (*Helicobacter pylori*, *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma mansoni* y *Trichinella spiralis*), se emplearon las mismas muestras de suero que en el estudio del reconocimiento del péptido sintético 3973 antes del inicio del tratamiento con benznidazol (ver apartado 1.3).

2- Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *T. cruzi* a partir de muestras clínicas fue el medio LIT (*liver infusion tryptose*).

Tabla 9. Composición del medio de cultivo LIT.

NaCl	4 g
KCl	0,4 g
Na ₂ PO ₄	8 g
Glucosa anhidra	2 g
Triptosa	5 g
Infusión de hígado	5 g
Hemina	25 mg
Suero Bovino Fetal (SBF)	100 ml
Agua bidestilada, c.s.p.	1000 ml

El pH del medio se ajustó a 7,2 y se esterilizó por filtración a través de filtros de membrana de 0,22 µm de diámetro de poro (Millipore®). Al medio esterilizado se le añadieron los antibióticos gentamicina y penicilina, a una concentración de 40 mg/l y 600.000 U/l, respectivamente.

3- Obtención de formas tripomastigotes de *T. cruzi*

La obtención de formas tripomastigotes *in vitro* se realizó infectando líneas celulares epiteliales LLC-MK₂ (Andrews y Colli, 1982). Las células, cultivadas en medio RPMI suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado, crecen en monocapa a 37°C y 5% de CO₂. Una vez alcanzada la semiconfluencia, los cultivos se infectaron con una proporción de tripomastigotes:célula de 3:1. A partir del cuarto día de incubación se empezó a recoger del sobrenadante las formas tripomastigotes del parásito, y se lavaron 3 veces con solución salina PBS.

4- Extracción de proteínas totales de formas tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*

La obtención del lisado de antígenos solubles de *T. cruzi*, se realizó utilizando formas tripomastigotes de la cepa Y obtenidas de ratones infectados. Se inoculó una monocapa de fibroblastos LLC-MK₂ a una multiplicidad de infección de 5:1 durante 12 horas. Posteriormente, las células se lavaron para retirar los parásitos que no habían infectado a los fibroblastos y se incubaron a 37°C en una atmósfera al 5% CO₂. Se obtuvo una mezcla de parásitos amastigotes:tripomastigotes (3:1) del sobrenadante de las mismas, y se lavaron 2 veces con PBS centrifugando a 3.500 rpm durante 30 minutos. El pellet se resuspendió en solución de lisis (Tris-ClH 50 mM pH 7,4, PMSF 1 mM, NP-40 0,05%, NaCl 50 mM, leupeptin 1µg/ml). A continuación se sometió la muestra a 3 ciclos de sonicación de 5 segundos a una frecuencia de 50-62 KHz. El extracto obtenido se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos a 4°C, y se recogió el sobrenadante que se conservó en alícuotas a -80° C hasta su uso.

5- Síntesis del péptido 3973

El péptido fue sintetizado en el laboratorio del Dr M.E. Patarroyo (Fundación Instituto de Inmunología Colombia, Bogotá, Colombia) y del Dr. O. Noya (Instituto de Medicina Tropical, Caracas, Venezuela) utilizando la metodología de fase sólida (Woolley y Merrifield, 1963) con las variaciones del sistema de síntesis múltiple en fase sólida (Houghten, 1985) y se purificó con éter etílico. La pureza se analizó por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en una columna semipreparativa C18 en fase reversa con un gradiente de acetonitrilo de 10-40%. Para verificar el proceso de síntesis se determinó el tiempo de retención del péptido mediante HPLC utilizando como control un péptido de secuencia conocida. A continuación, la correcta síntesis del péptido se verificó mediante secuenciación automática utilizando un secuenciador en fase líquida Beckman 890M.

Péptido de la proteína TcCA-2

3973	FGQAAAGDKPSL	Pm 1053,4
-------------	--------------	-----------

6- Técnicas parasitológicas

6.1- Concentración de Strout

La técnica consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 ml de sangre recogida sin anticoagulante, con incubación a 37°C durante 1 hora para que se retraiga el coagulo y los tripomastigotes queden suspendidos en el sobrenadante (Strout, 1962). Tras varios ciclos de centrifugación, primero para eliminar los hematíes residuales y luego para concentrar los parásitos, se observa el sedimento con el microscopio óptico a 400x.

6.2- Hemocultivo

Para su realización se siguió el protocolo descrito por Castro (2002). 30 ml de sangre venosa recogida con heparina de sodio como anticoagulante, se centrifuga 10 minutos a 1.000 g y se separa el paquete de hematíes y el plasma que contiene las células blancas y las plaquetas.

Los hematíes después de un lavado con medio LIT (*liver infusion tryptose*) se distribuyen en 6 tubos que contienen 3 ml de medio LIT. Por otro lado, las células suspendidas en el plasma se concentran mediante un ciclo de centrifugación y después se cultivan con 3 ml de medio LIT. Todos los tubos se mantienen a 27°C y se revisan semanalmente durante 3-6 meses.

6.3- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

6.3.1- Extracción de ADN a partir de sangre total

Se extrajeron 10 ml de sangre total de pacientes infectados con *T. cruzi*. Inmediatamente, se mezcló con igual volumen de tampón de lisis conteniendo Guanidina-ClH 6 M (Sigma, USA) y etilendiamino tetraacético (EDTA) 200 mM pH 8 (Avila y col., 1991) en tubos Falcon de 50 ml estériles (Becton Dickinson). De esta manera se homogeniza el ADN del parásito, se inhiben las ADNasas, y se conserva la muestra. Se hirvió durante 15 minutos para facilitar la rotura del ADN (Britto y col., 1993) y se conservó a 4°C hasta su uso.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit Maxwell® 16 Blood DNA Purification kit (Promega Corporation, Madison, USA) en el extractor automatizado Maxwell 16 (Promega Corporation, Madison, USA), empleando 400 microlitros de muestra según indicaciones del fabricante.

El ADN extraído se cuantificó (ng/μL) utilizando un espectrofotómetro UV/visible de mono haz (eppendorf *BioPhotometer plus*). Las mediciones se realizaron directamente empleando 1-2 μl de la muestra. El instrumento cuantifica la concentración de ácidos nucleicos de la muestra midiendo la absorbancia de las mismas a 260 nm y tomando como coeficiente de extinción 50 (μg/ml)⁻¹ cm⁻¹ para ADN. La calidad del ADN se determinó con la relación de valores de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀, considerando aceptables los superiores a la unidad.

6.3.2- Amplificación de ADN por PCR

La detección por PCR de la región variable de 330 pares de bases (pb)

del ADN de minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* se realizó como describe Gomes (1998) con ligeras modificaciones.

Brevemente, 200 ng de cada muestra se añadieron a un volumen final de 75 µl conteniendo 0,2 mM de mezcla de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Roche), 200 ng de cada uno de los cebadores (121 [5'-AAATAATGTACGGGKGATGCATGA-3'] y 122 [5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3']), 2,5U de *Taq* DNA polimerasa (Roche), 7,5 µl de 10x tampón *Taq* DNA polimerasa (Roche) y 2,5 mM de MgCl₂ (Roche).

La amplificación se realizó en un termociclador (2720 Thermal Cycler, *Applied Biosystem*) con un programa de amplificación que consta de un primer paso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de amplificación (94°C durante 1 minuto, 64°C durante 1 minuto y 72°C durante 1 minuto) y un ciclo final de extensión a 72°C durante 10 minutos.

Un protocolo similar se empleó para la amplificación del control interno (ADN ribosomal) con los cebadores REV (5'-GACGGTATCTGATCGTCTTC-3') y HUF (5'-GGACCGCCTGGATACCGC-3'). Todos los pasos de extracción y amplificación de las muestras fueron monitorizados y comparados con controles negativos y positivos.

Los productos amplificados se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (Pronadisa, Conda) a una concentración del 2% y tampón TBE 0,5x (Tris-clorhídrico [Tris-HCl] 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM pH 8,4) en cubetas de desarrollo horizontal. La solución se calentó en microondas hasta total disolución y se dejó solidificar en la cubeta de electroforesis. Las muestras se cargaron en los pocillos del gel con ayuda del tampón de carga (6x) (Sigma, USA). Para determinar el tamaño del producto amplificado se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases ("DNA ladder 100pb", Invitrogen). La electroforesis se realizó con las siguientes condiciones: 120 voltios, 60 minutos.

Por último los geles se tiñeron con bromuro de etidio 0,5 µg/ml

durante 10-15 minutos y se visualizaron y fotografiaron en transiluminador de ultravioleta conectado a un equipo de captura de imágenes (U: Genius, Syngene).

Para evitar cualquier problema de contaminación, todos los pasos de la reacción se realizaron en habitaciones separadas, empleando material y reactivos destinados exclusivamente para cada fase.

7- Técnicas serológicas

7.1- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

7.1.1- Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Para el análisis del título de anticuerpos anti-*T. cruzi* de las muestras de suero, se realizó el test Inmunofluor CHAGAS (Biocientífica S.A., Buenos Aires, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero se diluyeron en tampón fosfato (PBS) (1/80 y 1/160), y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con el sustrato antigénico. A continuación, las inmunoglobulinas no absorbidas se eliminaron tras dos lavados con PBS. Se incubó con anti-IgG, IgA, IgM humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 minutos a temperatura ambiente. De nuevo se realizaron dos lavados con PBS para eliminar el conjugado no unido. Los portaobjetos se montaron con tampón glicerina pH 9,5, y se observaron con microscopio de fluorescencia (Olympus U-RFLT50). El valor de punto de corte establecido fue un título $\geq 1/80$.

En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos suministrados en el reactivo.

7.1.2- Detección de anticuerpos anti-*Leishmania donovani*

Para el análisis del título de anticuerpos anti-*Leishmania* de las muestras de suero, se realizó el test IFI *Leishmania*-Spot IF (bioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de suero

se diluyeron en PBS (1/80 y 1/160), y se incubaron durante 30 minutos a 37°C con el sustrato antigénico. A continuación, las inmunoglobulinas no absorbidas se eliminaron tras dos lavados con PBS. Se incubó con anti-IgG, IgM humana marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) durante 30 minutos a 37°C. De nuevo se realizaron dos lavados con PBS para eliminar el conjugado no unido. Los portaobjetos se montaron con tampón glicerina pH 9,5, y se observaron con microscopio de fluorescencia. El valor de punto de corte establecido fue un título $\geq 1/80$.

En cada ensayo se incluyeron controles positivos y negativos suministrados en el reactivo.

7.2- Inmunocromatografía (ICT)

El ensayo inmunocromatográfico (OnSite Chagas Ab Combo Rapid Test, CTK Biotech, Inc., USA) se realizó según indicaciones del fabricante, añadiendo 20 µl de plasma seguido de 2 gotas (70-100 µl) de diluyente de la muestra en el pocillo correspondiente. Tras 15 minutos se realizó la lectura.

El test se consideró positivo si se observaban dos líneas violetas en la zona de control y test; se consideró negativo si sólo se observaba una línea violeta en la zona control e invalido cuando no apareció la línea en la zona control.

7.3- Enzimoinmunoensayos (EIA)

7.3.1-ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay) *in house*

7.3.1.1- Determinación de anticuerpos frente al lisado de antígenos solubles de *T. cruzi*

La determinación del título de anticuerpos frente al lisado de antígenos solubles de *T. cruzi* se realizó según el protocolo descrito en Thomas y colaboradores (2001).

Brevemente, placas ELISA de tiras de 8 pocillos (Maxixorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se fijaron con 0,5 µg de proteína/pocillo disuelta en 100 µl de solución NaHCO₃/Na₂CO₃ 10 mM pH 9,6, y se almacenaron en ambiente seco a -20°C hasta su uso. Posteriormente, los pocillos se lavaron dos veces con 200 µl de PBS-Tween-20 (0,05%) (Sigma, USA) e incubaron durante una hora con solución de bloqueo (PBS con 5% de leche desnatada). A continuación, los pocillos con el antígeno unido se incubaron con el suero del paciente a la dilución 1/6400, durante 2 horas a 37°C. La selección de la dilución de los sueros se estableció empleando un “pool” de sueros de 6 pacientes con enfermedad de Chagas procedentes de zona endémica. La dilución del antígeno empleada corresponde a la parte lineal de la curva tras un análisis de titración. Como anticuerpo secundario se usó anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa (Biosource, New York, USA) a la dilución 1:2000. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C. Tras el lavado, se reveló usando ortofenilendiamina (OPD, Merck, Germany) durante 5 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. La reacción se paró añadiendo ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 N (Merck).

Las absorbancias se midieron en un lector de ELISA (Asys Jupiter, Hitech GMBH, Austria) a 492 nm de longitud de onda. En cada placa se incluyeron controles positivos y negativos. La línea de corte se definió como el promedio de los valores de los controles negativos más 3 desviaciones estándar (cut-off [CO, “punto de corte”]).

7.3.1.2- Determinación de anticuerpos frente al péptido sintético 3973

La determinación de anticuerpos frente al péptido sintético 3973 se realizó siguiendo el método descrito en Thomas y colaboradores (2012). Brevemente, placas de microtitulación para ELISA (Maxixorp, Nunc, Roskilde, Dinamarca) se sensibilizaron con 100 µl de péptido (10 µg/ml en PBS) y almacenaron a -20°C hasta su uso.

Posteriormente, las placas se lavaron dos veces con 200 µl de PBS-Tween 20 (0,05%) (Sigma, USA) e incubaron durante media hora con solución de bloqueo (PBS con 2,5% de leche desnatada). La reacción inmunoenzimática se realizó mediante incubación de los sueros de los pacientes, 100 µl/pocillo, diluidos a 1/400 y 1/1600 en tampón PBS-Tween 20 (0,05%)-leche (2,5%), que se incubaron durante una hora a 37°C. Como anticuerpo secundario se emplearon anticuerpos de cabra anti-IgG humanas conjugados con peroxidasa (Biosource, New York, USA) a la dilución 1:2000. Tras una incubación de una hora a 37°C, se lavó y se procedió al revelado usando 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB, 0,4 g/l) y peróxido de hidrógeno (0,02%) (1:1) (KPL, USA) durante diez minutos a temperatura ambiente.

Las absorbancias se midieron en un lector de ELISA (Asys Jupiter, Hitech GMBH, Austria) a 620 nm de longitud de onda, a los 5 y 7 minutos. Las muestras de suero se analizaron por triplicado. En cada placa se incluyeron controles positivos y negativos. La línea de corte se definió como el promedio de los valores de los controles negativos más 3 desviaciones estándar (cut-off [CO, "punto de corte"]).

7.3.2-EIAs comerciales

7.3.2.1- Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi*

Se utilizaron dos kits comerciales que emplean proteínas de fusión de *T. cruzi*, compuestas por diferentes péptidos activos (BioELISA Chagas, Biokit, Lliça d'Amunt, España; Chagatest ELISA recombinante v.3.0, Wiener lab., Rosario, Argentina) y un kit comercial que emplea antígeno completo del parásito (ORTHO® *T. cruzi* ELISA test System, Ortho Clinical Diagnostics, New Jersey, USA). El conjugado enzimático incluido en los kits está constituido por anticuerpos de conejo anti-IgM y/o anti-IgG humanas marcados con peroxidasa. Las técnicas se han realizado siguiendo las instrucciones del fabricante.

De acuerdo con ellas, las muestras, controles y/o calibradores se añadirán a los pocillos recubiertos de los antígenos correspondientes. Si en una muestra existen anticuerpos específicos frente a *T. cruzi*, se formará un complejo estable con el antígeno que recubre el pocillo. Después de lavar para eliminar los anticuerpos no unidos, se añadirán anticuerpos unidos a la peroxidasa, y si el complejo antígeno-anticuerpo está presente, el conjugado se fijará. Después de un lavado se añadirá el sustrato enzimático y el cromógeno. Si la muestra es positiva desarrollará color. A continuación se añadirá ácido sulfúrico para detener la reacción. La intensidad de color se determinará con un espectrofotómetro que medirá la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm con una longitud de onda de referencia a 620 nm.

Los resultados se expresaron en forma de *ratio*, que es la relación existente entre la absorbancia del suero problema y el valor umbral, que se calcula añadiendo 0.300 a la absorbancia media obtenida de tres réplicas del suero control negativo (ELISA Biokit, ELISA Wiener), o multiplicando por 0.460 la media de calibradores (ELISA Ortho).

En la Tabla 10 se describen las características de las pruebas utilizadas. La comparación de la reactividad entre los diferentes ensayos ELISA se realizó mediante el cálculo del índice de densidad óptica (DO)/CO.

Tabla 10. Características e interpretación de las pruebas de detección de anticuerpos anti- *Trypanosoma cruzi*.

Prueba	Antígeno	Conjugado	Tiempo (min)	CO	Positivo	Negativo	Dudoso
IFI	Epimastigotes	Anti-IgG humana (FITC)	90	1/80	$\geq 1/80$	$< 1/40$	1/40
ELISA Ortho	Extracto total	Anti-IgG humana (HRP)	120	mCPx0.460	$DO/CO \geq 1$	$DO/CO < 1$	No existe esta opción
ELISA Biokit	TcD, TcE, Pep2, TcLo1.2	Anti-IgG humana Anti-IgM humana (HRP)	120	mCN+0.300	$DO/CO \geq 1$	$DO/CO < 0.9$	$DO/CO \geq 0.9$ a < 1
ELISA Wiener	SAPA, Ag1, Ag2, Ag13, Ag30, Ag36	Anti-IgG humana (HRP)	90	mCN+0.300	$DO/CO \geq 1$	$DO/CO < 0.9$	$DO/CO \geq 0.9$ a < 1
ELISA In house	Extracto soluble (amastigotes/tripomastigotes)	Anti-IgG humana (HRP)	300	mCN+3DS	$DO \geq CO$	$DO < (0.9 \times CO)$	$DO \geq 0.9CO$ a $< CO$
ICT	Antígenos recombinantes	Anti-IgG humana (oro coloidal)	15	No establecido	Dos bandas	Banda control	No existe esta opción

7.3.2.2- Inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA)

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

Sucintamente, se trata de un procedimiento que en un primer paso combina la muestra y el diluyente de la misma. Tras esto, se mezcla con 4 antígenos recombinantes de *T. cruzi* (FP3, FP6, FP10 y TcF) (Chang y col., 2006; Cheng y col., 2007; Hoft y col., 1989; Houghton y col., 2000) unidos a micropartículas magnéticas. Los antígenos recombinantes empleados se detallan en la Tabla 11.

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

El resultado de la reacción quimioluminiscente se mide como unidades relativas de luz (RLUs). Existe una relación directa entre la cantidad de anticuerpos frente a *T. cruzi* en la muestra y las RLUs detectadas. Los resultados son calculados automáticamente basándose en la comparación con el Índice Calibrator. Los resultados se representan como un ratio de la señal de la muestra (en RLUs) y el valor del punto de corte (S/CO), donde valores de $S/CO \geq 1$ son considerados como positivos, valores de $S/CO \geq 0.8$ a 0.99 son considerados zona gris, y valores $S/CO < 0.8$ son considerados negativos.

El inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) (ARCHITECT Chagas®, Abbott) se realizó empleando el sistema ARCHITECT i2000_{SR} (Abbott).

Tabla 11. Antígenos recombinantes usados en el ensayo ARCHITECT Chagas (Praast y col., 2011).

Antígeno recombinante y dominio antigénico	Descripción
TcF	
PEP-2	GDKPSPFQA AA GDKPSPFGQA
TcD	AEPKS AEPKP AEPKS
TcE	KAAIAPA KAAAAPA KAATAPA
TcLo1.2	SSMP S GTSEEGSRGGSSMPA
FP3	
TcR27	Proteína citoplasmática
FCaBP	Proteína flagelar
FP6	
TcR39	Proteína membrana-citoesqueleto
FRA	Proteína flagelar repetitiva
FP10	
SAPA	Antígeno de fase aguda
MAP	Proteína asociada al microtúbulo

7.3.2.3- Detección de anticuerpos anti-*Helicobacter pylori*

La presencia de anticuerpos específicos frente a *H. pylori* se determinó mediante el ELISA comercial DRG Helicobacter pylori IgG (Recombinant) (DRG Diagnostics, Alemania). El antígeno empleado en este test es una proteína recombinante del gen *Cag A* de *H. pylori*.

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de los pacientes previamente diluidas 1/100 y los controles se dispensaron en los pocillos correspondientes y se incubó a 37°C durante 1 hora. Durante este tiempo, los anticuerpos específicos frente a *H. pylori* de las muestras y controles positivos se unirán al antígeno. Tras varios lavados para eliminar el material no unido al antígeno, se añadió el conjugado enzimático constituido por anticuerpos anti-IgG humanas marcados con peroxidasa. Durante una segunda incubación se formará el

complejo anticuerpo-conjugado que es detectado mediante el sustrato TMB. La intensidad del color desarrollado será proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* que haya en la muestra del paciente.

La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas a una longitud de onda de 450/620 nm.

Los pacientes con serología positiva fueron considerados infectados con *H. pylori*, ya que la eliminación espontánea de la bacteria sin tratamiento es rara. La concentración de anticuerpos IgG en las muestras de suero se calculó por interpolación, a partir de una curva estándar construida con los valores de absorbancia obtenidos de 4 calibradores frente a las correspondientes concentraciones (calibrador 0: 0 U/mL, calibrador 1: 15 U/mL, calibrador 2: 75 U/mL, calibrador 3: 150 U/mL).

El valor del punto de corte establecido por la técnica fue 15 U/mL, donde valores > 18 U/mL fueron considerados como positivo, valores entre 15-18 U/mL como zona gris, y valores < 15 U/mL fueron considerados negativos.

7.3.2.4- Detección de anticuerpos frente a helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis*)

La presencia de anticuerpos específicos frente a las diferentes especies de helmintos se determinó mediante ELISAs comerciales (*Ascaris lumbricoides* IgG ELISA; *Strongyloides* IgG ELISA; *Schistosoma mansoni* IgG ELISA; *Trichinella spiralis* IgG ELISA, DRG Diagnostics, Alemania). Cada test contiene antígenos específicos frente al parásito en cuestión.

Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de los pacientes, previamente diluidas, y los controles se dispensaron en los pocillos correspondientes y se incubaron a 37°C con el antígeno. Durante este tiempo los anticuerpos específicos de las muestras y controles positivos se unirán al antígeno correspondiente. Tras varios lavados para eliminar el material no unido al antígeno, se añadió el

conjugado enzimático constituido por Proteína A marcada con peroxidasa. Durante una segunda incubación se formará el complejo anticuerpo-conjugado que se detectó mediante el sustrato TMB.

Finalmente se añadió ácido sulfúrico para detener la reacción, causando un cambio de coloración de azul a amarillo. La lectura de la absorbancia se realizó en un lector de placas a una longitud de onda de 450/620 nm.

El valor del punto de corte (CO) establecido por la técnica para *A. lumbricoides* y *S. mansoni* fué la media de los valores de absorbancia de los dos “cut-off” control. Se consideró como positivo valores superiores al 10% del CO, valores de +/- 10% de la absorbancia se consideraron zona gris, y valores < 10% se consideraron negativos.

En el caso de *S. stercoralis* y *T. spiralis* se consideró un resultado positivo cualquier absorbancia $\geq 0,2$ DO.

8- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con los programas estadísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago IL) y GraphPad Prism versión 5.0 para Windows.

El estudio de la relación entre las variables cualitativas se realizó empleando el test chi-cuadrado.

Se compararon los resultados obtenidos con las pruebas serológicas y parasitológicas en las diferentes muestras de los grupos de individuos. Los resultados se ordenaron en una tabla de contingencia 2x2 y se calcularon los índices diagnósticos: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN). Se determinó el índice de kappa para evaluar la concordancia entre los resultados.

Para determinar diferencias significativas entre los diferentes grupos de pacientes se empleó la prueba no paramétrica U de Mann Withney. Para

el estudio comparativo antes y tras dos años de tratamiento dentro del mismo grupo de pacientes se utilizó el test de Wilcoxon.

Se consideró estadísticamente significativo un valor de p inferior a 0,05.

9- Consideraciones éticas

Para la realización del trabajo se emplearon muestras de pacientes incluidos en un estudio más amplio, cuyos algoritmos de diagnóstico, esquemas de tratamiento y protocolos de seguimiento fueron aprobados por el Comité Ético del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca (Murcia). Los pacientes fueron informados con todo detalle acerca del estudio y bajo consentimiento informado aceptaron formar parte del mismo.

IV. RESULTADOS

1- Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica mediante técnicas parasitológicas

1.1- Microscopía óptica

Se realizó el estudio microscópico mediante la técnica de Strout a 107 muestras de sangre, pertenecientes a pacientes con enfermedad de Chagas en estadio crónico, diagnosticados previamente mediante serología.

El resultado en todas ellas fue negativo.

1.2- Hemocultivo

Se procedió al cultivo de sangre en 15 pacientes diagnosticados previamente mediante serología de enfermedad de Chagas en fase crónica, en todos ellos el resultado fue negativo.

1.3- Utilización de la PCR como herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas

Para la valoración de la técnica PCR como herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas, se emplearon 105 muestras de sangre procedente de pacientes con infección crónica por *T. cruzi*.

Observamos el producto amplificado de 330 pares de bases (pb) correspondiente a la región kADN de *T. cruzi* en 69 de los 105 pacientes (Figura 11).

La técnica de PCR alcanzó una sensibilidad diagnóstica del 65,7% (IC 95%: 55,7-74,7).

Los resultados fueron validados mediante la detección de una banda de 200pb, producto de amplificación del ADN de la región ribosomal, que nos asegura que la ausencia de amplificación no es debida a inhibidores de la PCR.

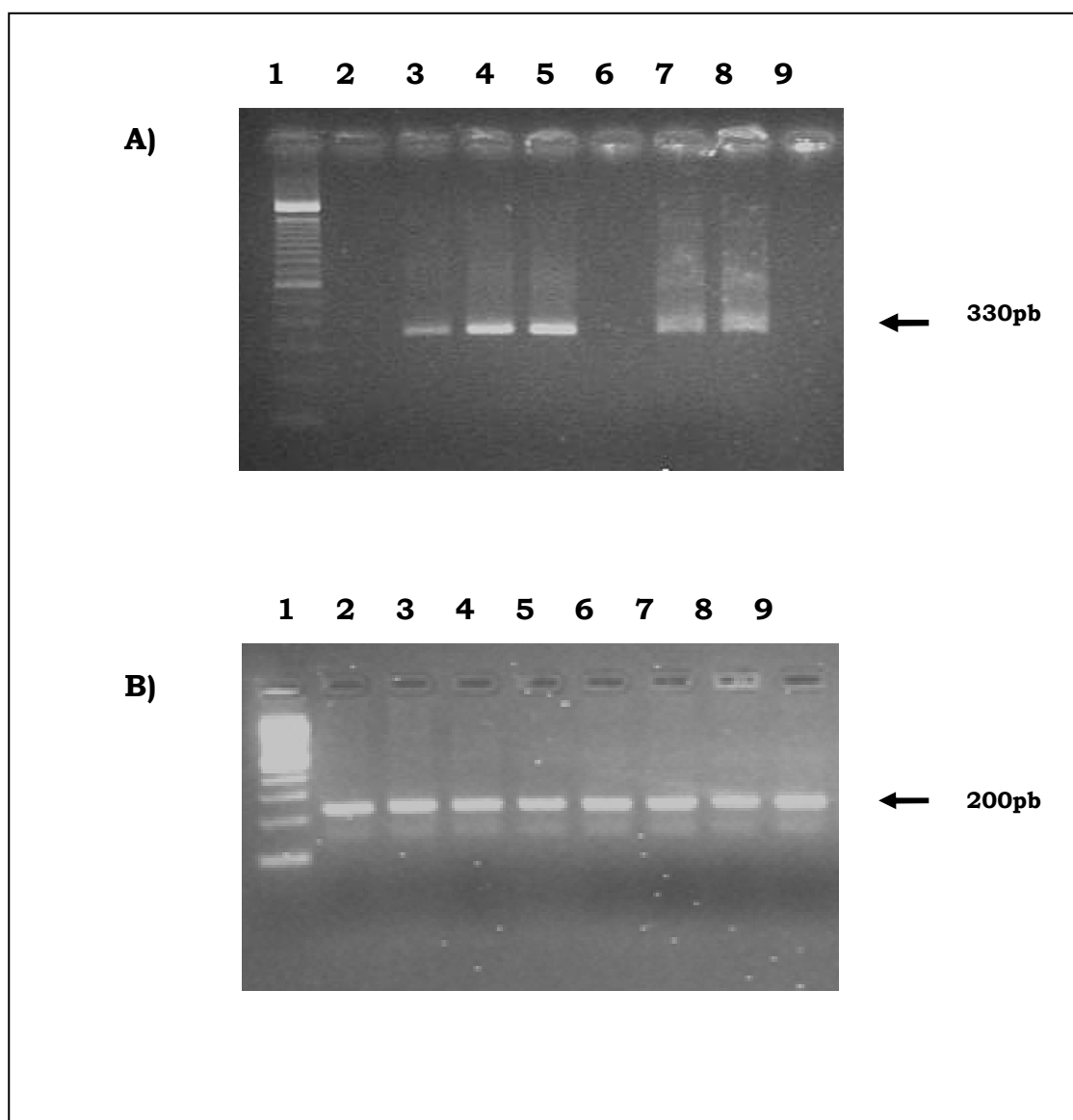


Figura 11. A. Resultados representativos de la detección de la región kDNA de *T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica mediante amplificación por PCR. **B.** Resultados representativos de la detección del control interno mediante amplificación por PCR. Calle 1: marcador de peso molecular 100pb; calles 3, 4, 5, 7: muestras de pacientes con resultado positivo; calles 2, 6: muestras de pacientes con resultado negativo; calle 8: Control positivo *T. cruzi* cepa Y; calle 9: Control negativo (sangre de donante seronegativo). Las flechas indican los productos de amplificación de 330pb de *T. cruzi* y 200pb del control interno.

Al analizar los resultados obtenidos en función de diferentes variables, observamos que la PCR con resultado positivo fue significativamente más frecuente en pacientes entre 2-19 años, que en pacientes en los rangos de edad 20-39 y mayores de 40 años ($p=0,01$) (100%, 69,2% y 47,8%, respectivamente). En cuanto al tiempo de estancia en España, la PCR positiva fue significativamente superior en aquellos pacientes que llevaban menos de 3 años residiendo en nuestro país (76%) ($p=0,03$). Sin embargo, no observamos diferencias significativas entre pacientes asintomáticos (66%) y con sintomatología (65,5%) ($p=0,95$) (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados de la técnica diagnóstica PCR según la variable estudiada.

Variable	PCR + n/total (%)	PCR - n/total (%)
Edad		
2-19 años	4/4 (100)	0/4 (0)
20-39 años	54/78 (69,2)	24/78 (30,8)
≥ 40 años	11/23 (47,8)	12/23 (52,2)
Años de residencia en España		
< 3 años	38/50 (76)	12/50 (24)
≥ 3 años	31/55 (56,4)	24/55 (43,6)
Sintomatología		
Asintomático	33/50 (66)	17/50 (34)
Sintomático	36/55 (65,5)	19/55 (34,5)

2- Diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica mediante técnicas serológicas

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se ha convertido en una práctica frecuente en España, consecuencia del elevado número de inmigrantes procedentes de América Central y del Sur que en la actualidad residen en nuestro país.

Durante el periodo 2008-2011, en nuestro Servicio se ha realizado el análisis serológico de 4.739 muestras de suero, pertenecientes a pacientes procedentes de zonas endémicas, atendidos en diversas consultas de la región, con una media anual de 1.185 determinaciones (2008: 1.194 determinaciones, 2009: 1.478 determinaciones, 2010: 1.066 determinaciones, 2011: 1.001 determinaciones). Para ello se emplearon dos pruebas serológicas con diferentes principio antigénico de forma simultánea. Las dos técnicas proporcionaron resultados similares, y las pocas discrepancias observadas lo fueron siempre a partir de valores próximos al umbral de positividad establecido para ambas técnicas.

Observamos que el número de peticiones a lo largo del periodo de estudio se mantiene constante, a excepción del año 2009, donde se produjo un aumento del 27,8% en el número de determinaciones.

En estos cuatro años, 2.193 muestras fueron serorreactivas (46,3%) para *T. cruzi* y un 2,9% tuvieron un resultado indeterminado o discordante (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados discordantes en las pruebas serológicas empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas durante el periodo 2008-2011.

	2008	2009	2010	2011
ELISA+/IFI -	31	26	24	40
ELISA -/IFI +	6	2	-	5
ELISA ID/ IFI +	2	1	-	-

La evolución en el número de determinaciones mensuales realizadas, así como el desglose de los resultados obtenidos en función del año, quedan reflejados en las Figuras 12 y 13.

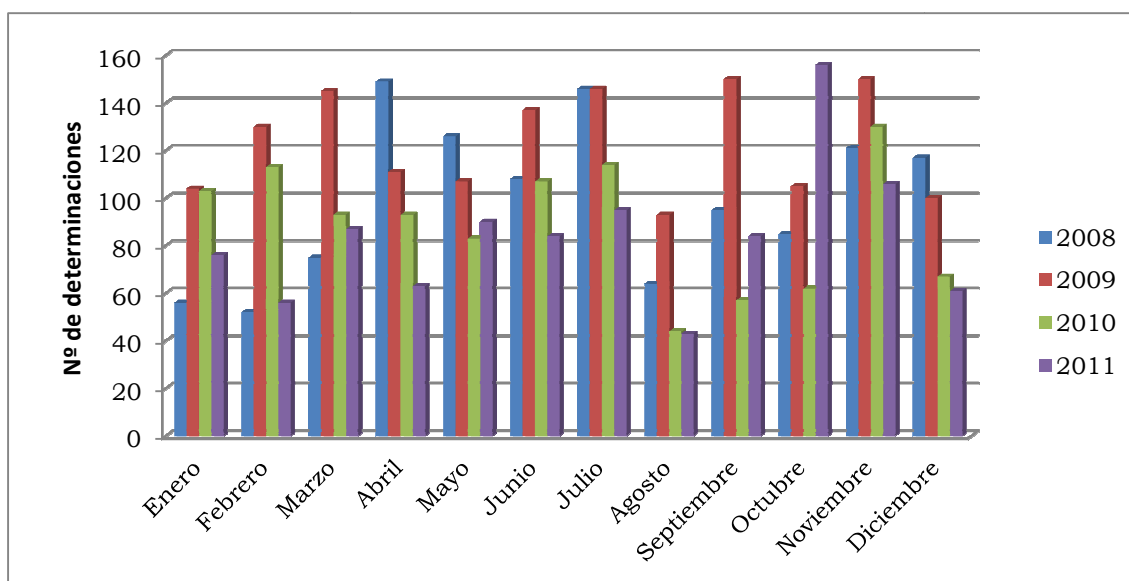


Figura 11. Evolución en el número de determinaciones mensuales realizadas durante los años 2008-2011.

La mayor parte de las determinaciones fueron solicitadas por el hospital y centros de salud pertenecientes al Área de Salud I (Murcia/Oeste) (66,1%) (Figura 14) (Tabla 14).



Figura 14. La zona en color representa la Gerencia del Área de Salud I de la Región de Murcia.

Fuente: Consejería de Sanidad y Consumo. Dirección General de Planificación, Ordenación Sanitaria y Farmacéutica e Investigación.

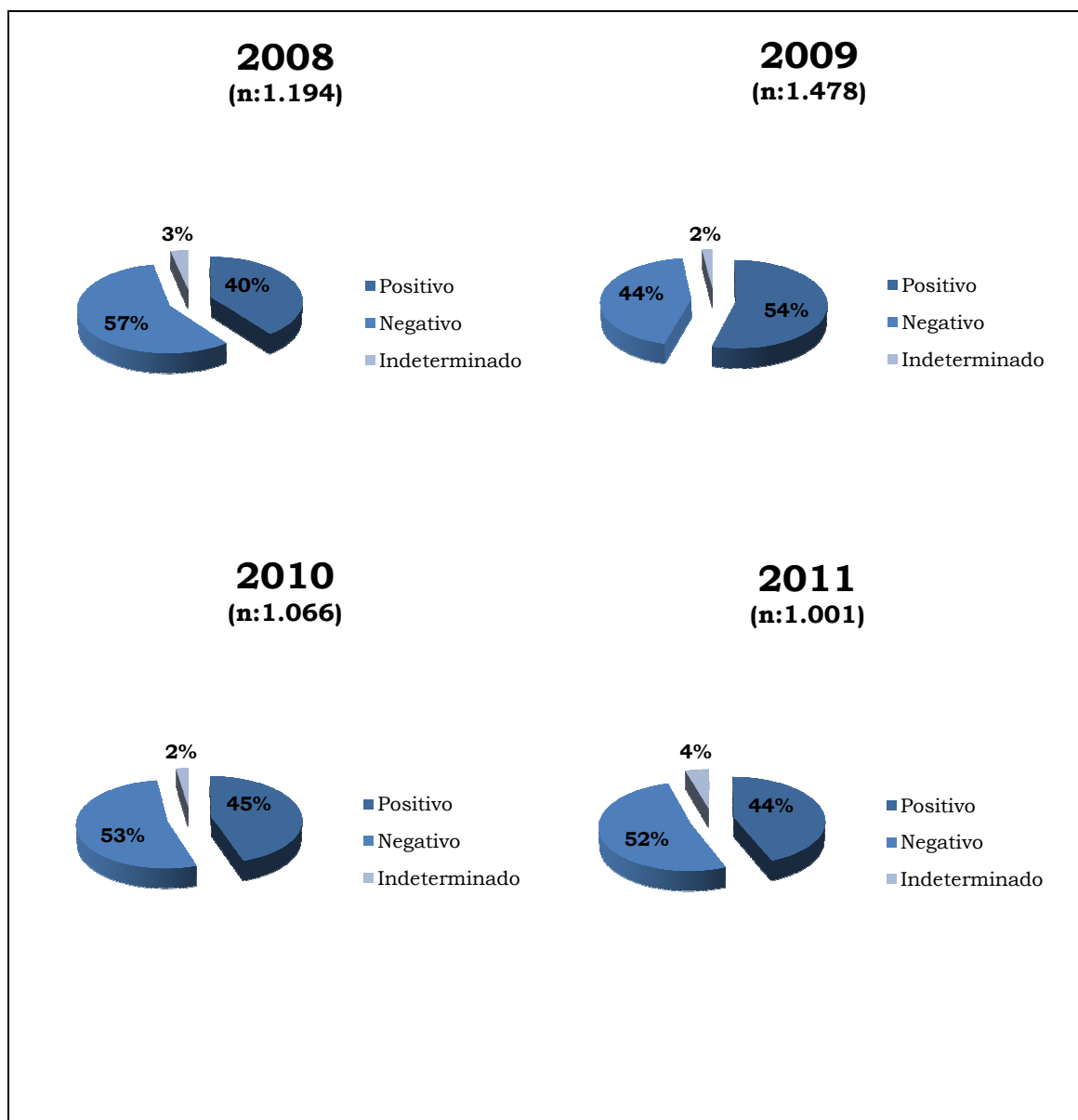


Figura 13. Resultados de serología de Chagas obtenidos en las muestras analizadas en el Servicio de Microbiología durante los años 2008-2011.

El 59,3% (2.814/4.739) de las muestras a las que se realizó las determinaciones fueron mujeres. Se dispuso del dato de la edad en 4.156 muestras de pacientes, con una mediana de 32 años (rango: 0-94 años).

El 80,3% (1.990/2.476) de las mujeres con edad conocida eran mujeres en edad fértil (15-49 años), y de estas el 51,2% (1019/1990) presentaban una serología positiva para *T. cruzi*.

Tabla 14. Determinaciones solicitadas para el diagnóstico serológico de enfermedad de Chagas por los diferentes hospitales y centros de salud de la Región de Murcia.

Áreas de Salud	Nº de determinaciones solicitadas				
	2008	2009	2010	2011	Total (%)
Área de Salud I (Murcia/Oeste)	3.135 (66,1)				
HU Virgen de la Arrixaca	520	919	628	663	
Centros de Salud	130	123	83	69	
Área de Salud II (Cartagena)	41 (0,8)				
HGU Santa Lucía	4	8	19	10	
Área de Salud III (Lorca)	319 (8,5)				
H. Rafael Méndez	198	138	92	89	
Área de Salud IV (Noroeste)	109 (2,3)				
H. Comarcal de Noroeste	31	32	13	33	
Área de Salud V (Altiplano)	442 (9,3)				
H. Virgen del Castillo	213	126	73	30	
Área de Salud VI (Vega Media del Segura)	390 (8,2)				
HGU Morales Meseguer	74	118	118	80	
Área de Salud VII (Murcia/Este)	22 (0,5)				
HGU Reina Sofía	3	2	7	10	
Área de Salud VIII (Mar Menor)	64 (1,3)				
HGU Los Arcos del Mar Menor	16	7	28	13	
Área de Salud IX (Vega Alta del Segura)	19 (0,4)				
H. de la Vega Lorenzo Guirao	5	5	5	4	

2.1- Pruebas convencionales y no convencionales

2.1.1-Comparación de la reactividad de diferentes técnicas de diagnóstico serológico

Para la comparación de la reactividad de diferentes técnicas de diagnóstico serológico se han utilizado un total de 173 muestras de suero.

De estas 173 muestras de suero, 107 pertenecían a pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas en estadio crónico, 50 muestras a pacientes control sanos y 16 muestras a pacientes con diferentes enfermedades infecciosas.

De las 107 muestras de suero de pacientes seropositivos, 101 (94,4%) fueron positivas con todas las pruebas serológicas empleadas (Tabla 15).

Tabla 15. Sueros reactivos en las diferentes pruebas de detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

Características de los sueros	Nº de sueros	Nº de muestras con resultados positivos					
		IFI	Ortho	<i>In house</i>	Biokit	Wiener	ICT
Enf de Chagas	107	107	107	107	107	107	101
Sanos	50	0	0	0	2	1	4

Por otra parte, el 92% (46/50) de los sueros de los controles sanos presentaron resultados negativos en todas las pruebas. Sólo las pruebas no convencionales (ELISA Biokit, ELISA Wiener e ICT) mostraron resultados falsamente positivos, y estos resultados fueron concordantes entre sí en el caso de las técnicas ELISA (Tabla 16).

Tabla 16. Comparación de las muestras con resultados discrepantes.

		DO/CO					
EC	Código	IFI	Ortho	In house	Biokit	Wiener	ICT
Enf de Chagas	Mu-4	>1/160	3.2	1.4	7.1	8.4	Negativo
	Mu-43	>1/160	5.9	3.4	7.2	8.0	Negativo
	Mu-63	1/80	1.9	1.3	3.5	6.7	Negativo
	Mu-70	1/160	1	1.5	7.3	3.2	Negativo
	Mu-75	1/80	1.2	1.1	>13	8.3	Negativo
	Mu-100	>1/160	8.0	1.8	6.4	7.2	Negativo
Sanos	3.1	Negativo	0.04	0.94	6.3	0.00	Negativo
	50.1	Negativo	0.24	0.92	3.4	1.63	Negativo
	18.1	Negativo	0.02	0.88	0.25	0.00	Positivo
	27.1	Negativo	0.16	0.78	0.13	0.00	Positivo
	33.1	Negativo	0.07	0.84	0.32	0.00	Positivo
	42.1	Negativo	0.02	0.84	0.04	0.00	Positivo

Los títulos de anticuerpos obtenidos al realizar la técnica de IFI se muestran en la Figura 15. El 83,2% de las muestras de pacientes seropositivos tuvo un título de IFI superior a 1/160 (2 diluciones por encima del punto de corte establecido de 1/80), mientras que los títulos obtenidos en el grupo control fueron negativos. En el grupo de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas, en 3 de ellas (18,7%) se detectaron títulos iguales o superiores a 1/80 (2 muestras con anticuerpos frente a *Leishmania* y 1 frente a *Plasmodium*).

En cuanto a los resultados de DO/CO de las diferentes técnicas ELISA (Figura 16), si observamos la media de DO/CO de las técnicas convencionales, en el ELISA Ortho los pacientes seropositivos tienen un valor de 6.6; sin embargo, la media está cercana a cero en el grupo control seronegativo (0.17). Esta discriminación entre pacientes seropositivos y seronegativos, en cambio, no fue tan clara para el ELISA *in house*, con una media de DO/CO de las muestras seropositivas (2.4) y seronegativas (0.87) cercana al valor del punto de corte.

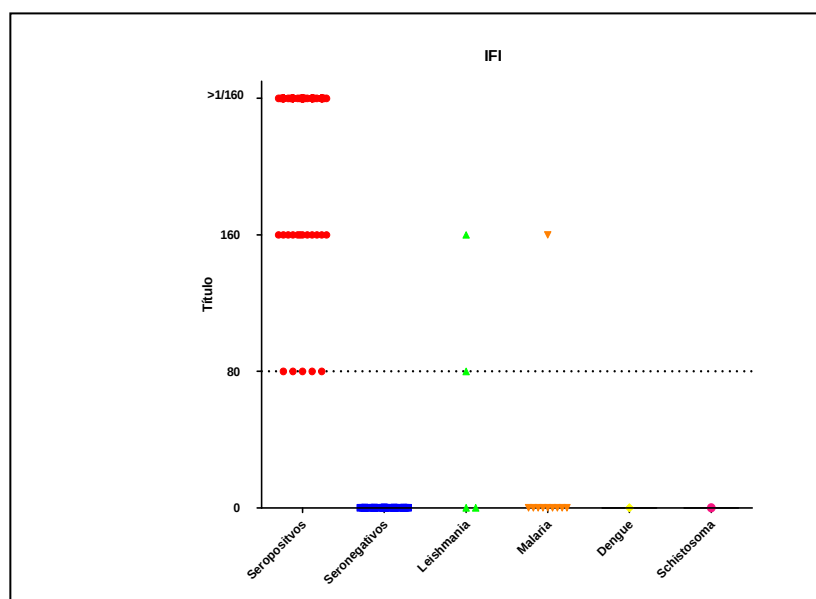


Figura 15. Títulos de anticuerpos obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta según el grupo de muestras considerado. Línea horizontal discontinua a 1/80: CO.

Por lo que respecta a las técnicas no convencionales, cuando tenemos en cuenta la media de DO/CO de los pacientes con enfermedad de Chagas en el ELISA Wiener (7.6) y ELISA Biokit (8.9) y pacientes controles sanos con media de DO/CO de 0.04 y 0.34, respectivamente, la discriminación entre ambos grupos es clara.

En el grupo de otras enfermedades infecciosas, el ELISA Wiener sería el que obtendría valores de media de DO/CO más bajos, y por tanto más alejados del punto de corte. Destacan las elevadas medias de DO/CO de las muestras con anticuerpos frente a *Plasmodium* (1.03), *Leishmania* (0.97), virus del dengue (0.86) y *Schistosoma* (0.86) del ELISA *in house*, todas ellas próximas al punto de corte.

En cuanto a las muestras negativas con resultado discrepante en la técnica ELISA, la media de DO/CO de las muestras de los pacientes sanos en el ELISA Biokit fue de 0.15 (rango, 0.04 a 0.7) y de 0.01 (rango, 0.0 a 0.28) en el ELISA Wiener; sin embargo, la media de DO/CO de las 2

muestras con resultado positivo en el ELISA Biokit fue 4.85, y 1.63 en el ELISA Wiener.

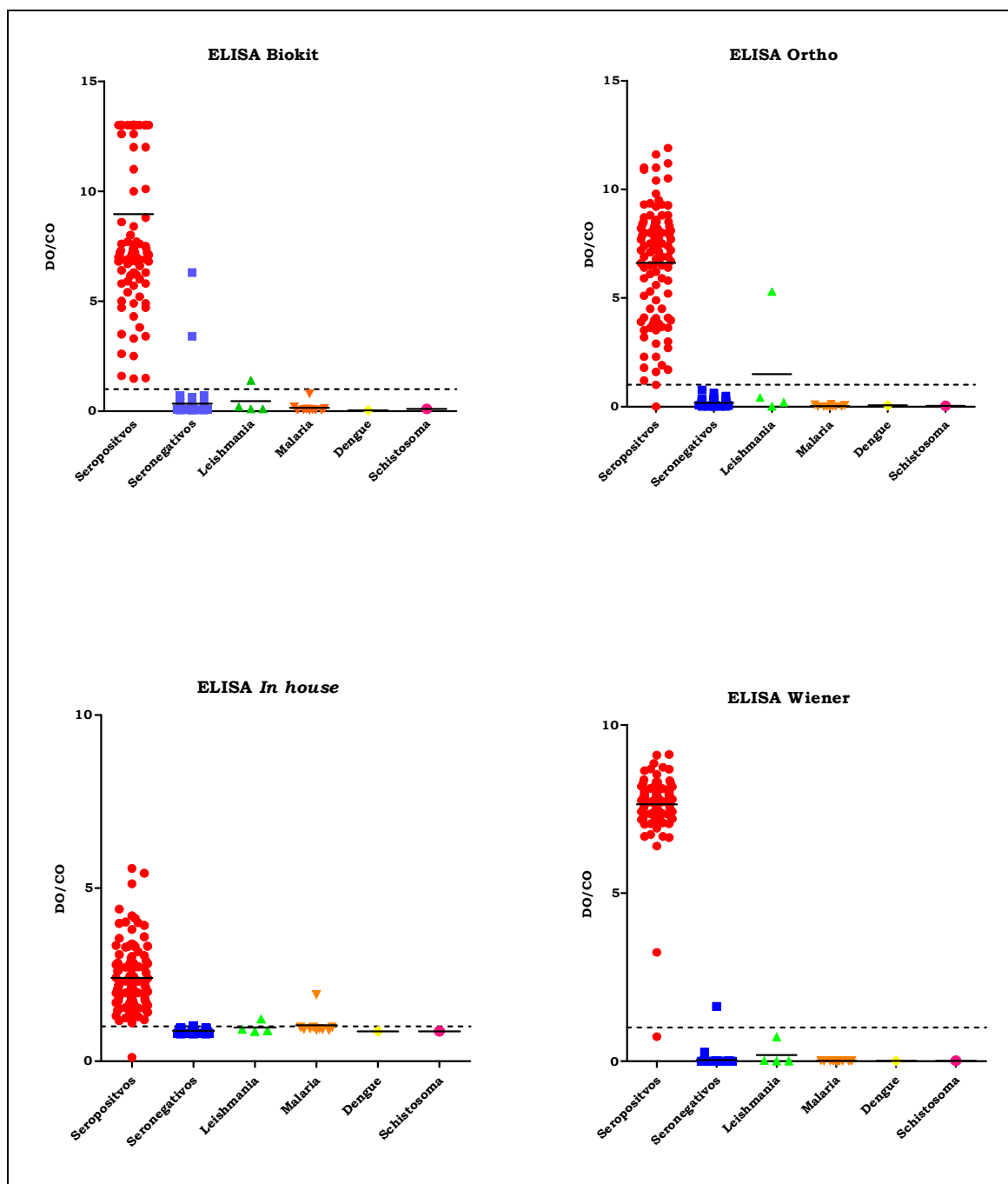


Figura 16. Comparación de los niveles de anticuerpos anti-*T. cruzi* observados en los diferentes ensayos de enzimoimmunoanálisis según el grupo de pacientes. La línea horizontal dentro de cada grupo indica la media aritmética. Línea horizontal discontinua a 1: CO.

2.1.2- Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

Todas las pruebas serológicas empleadas en la comparación mostraron una sensibilidad elevada (Tabla 17). Las pruebas convencionales (IFI, ELISA Ortho, ELISA *in house*) presentaron una sensibilidad del 100%, y las no convencionales (ELISA Biokit, ELISA Wiener, ICT) tuvieron valores que variaron desde el 94 al 100%. La especificidad en general fue elevada en todos los ensayos, y los valores calculados oscilaron entre el 92 y el 100%.

Todas las pruebas convencionales mostraron una especificidad del 100%, mientras que las no convencionales no superaron el 98%. La técnica que presentó una menor sensibilidad y especificidad (94,4% y 92%, respectivamente) fue la inmunocromatografía.

En cuanto a los valores predictivos de las diferentes técnicas, IFI, ELISA Ortho y ELISA *in house* tuvieron un valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) del 100%; el resto de pruebas ELISA tuvieron VPP cercanos al 100%.

Tabla 17. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las técnicas empleadas para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

	Enf de Chagas n° positivos (n:107)	Sensibilidad (IC 95%)	Sanos n° positivos (n:50)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
IFI	107	100 (95,7-100)	0	100 (91,1-100)	100 (95,7-100)	100 (91,1-100)
Ortho	107	100 (95,7-100)	0	100 (91,1-100)	100 (95,7-100)	100 (91,1-100)
<i>In house</i>	107	100 (95,7-100)	0	100 (91,1-100)	100 (95,7-100)	100 (91,1-100)
Biokit	107	100 (95,7-100)	2	96 (85,1-99,3)	98 (92,8-99,7)	100 (90,7-100)
Wiener	107	100 (95,7-100)	1	98 (87,9-99,9)	99 (94,2-99,9)	100(90,9-100)
ICT	101	94,4 (87,7-97,7)	4	92 (79,9-97,4)	96,2 (89,9-98,7)	88,5(75,9-95,2)

2.1.3-Estudio de la reactividad cruzada

Tanto los test convencionales (IFI, ELISA Ortho, ELISA *in house*) como los no convencionales (ELISA Biokit), mostraron reacciones cruzadas con sueros positivos con anticuerpos dirigidos frente a otros parásitos o agentes infecciosos (Tabla 18). No se observaron reacciones cruzadas con ninguno de los test (IFI, ELISA o ICT) para los sueros con anticuerpos frente a virus del dengue (n:1) y *Schistosoma* (n:1).

Dos sueros con anticuerpos frente a *Leishmania* fueron positivos por la técnica de IFI; esas mismas muestras fueron también positivas con los test ELISA Ortho, ELISA Biokit o ELISA *in house*.

De los 10 sueros de pacientes con anticuerpos frente a *Plasmodium*, uno de ellos fue positivo con IFI y otro de ellos con ELISA *in house*.

Tabla 18. Resultados positivos en el grupo de sueros con anticuerpos frente a otros parásitos o agentes infecciosos.

	Nº total de muestras	Nº total de resultados positivos (%)					
		IFI	Ortho	<i>In house</i>	Biokit	Wiener	ICT
<i>Schistosoma</i>	1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Leishmania</i>	4	2(50)	1(25)	1(25)	1(25)	0(0)	0(0)
Virus del dengue	1	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
<i>Plasmodium</i>	10	1(10)	0(0)	1(10)	0(0)	0(0)	0(0)

2.1.4-Impacto de la reactividad cruzada en la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo

Todos los ensayos convencionales (IFI, ELISA Ortho, ELISA *in house*) tuvieron reacciones cruzadas con los sueros de *Leishmania*. Estas reacciones variaron entre el 25 y 50%, y fue considerablemente menor en los ensayos no convencionales, siendo ELISA Biokit el único que presentó una reacción cruzada (Tabla 18). El grado de reactividad fue bastante

amplio, en especial en las muestras de los individuos con *Leishmania*, con valores de densidad óptica elevados (Figura 15).

Al calcular de nuevo los índices diagnósticos incluyendo los datos obtenidos con los sueros de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas, las pruebas convencionales (IFI, ELISA Ortho y ELISA *in house*) presentaron menor especificidad, con un rango entre 95,5 y el 97% (Tabla 19). En cambio las pruebas no convencionales mostraron valores próximos a los obtenidos en el anterior análisis (94 al 98,5%) y similares a las convencionales.

La técnica de ICT continuó teniendo valores de sensibilidad (94,4%) y especificidad (93,9%) inferiores al resto de las pruebas.

Los VPP de todas las técnicas convencionales disminuyeron, no alcanzando ninguna el 100%; mientras que en las no convencionales se mantuvieron valores similares.

En cuanto al VPN, todas las pruebas (convencionales y no convencionales) permanecieron en valores del 100%, excepto la ICT cuyo valor aumentó del 88,5% al 91,2%.

Tabla 19. Sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de las técnicas empleadas para la detección de anticuerpos anti-*T.cruzi*.

	Enf de Chagss n° positivos (n:107)	Sensibilidad (IC 95%)	Sanos +otras enfermedades n° positivos (n:66)	Especificidad (IC 95%)	VPP (IC 95%)	VPN (IC 95%)
IFI	107	100 (95,7-100)	3	95,5 (86,4-98,8)	97,3 (91,6-99,3)	100 (92,8-100)
Ortho	107	100 (95,7-100)	1	98,5 (90,7-99,9)	99 (94,2-99,9)	100 (92,8-100)
<i>In house</i>	107	100 (95,7-100)	2	96,9 (88,5-99,5)	98,1(92,8-99,7)	100 (92,8-100)
Biokit	107	100 (95,7-100)	2	95,4 (86,4-98,8)	97,3 (91,6-99,3)	100 (92,8-100)
Wiener	107	100 (95,7-100)	3	98,5 (90,7-99,9)	99 (94,2-99,9)	100 (92,8-100)
ICT	101	94,4 (87,7-97,7)	4	93,9 (84,4-98)	96,2 (89,9-98,7)	91,2 (81,1-96,3)

2.1.5-Análisis de concordancia de las diferentes técnicas serológicas

El análisis de concordancia entre los ensayos convencionales y no convencionales se realizó mediante el parámetro estadístico kappa (k). La concordancia fue elevada cuando se analizó el conjunto de resultados obtenidos con los sueros correspondientes a pacientes con enfermedad de Chagas y controles sanos. Los índices k de las diferentes técnicas variaron entre 0,85 y 1 (Tabla 20). La mayor concordancia se observó al emplear test convencionales, mientras que la menor se observó al combinar técnicas como IFI o ELISA (tanto convencional como no convencional) e ICT.

Tabla 20. Evaluación de la concordancia entre las diferentes técnicas serológicas mediante el índice estadístico kappa.

	Ortho	IFI	<i>In house</i>	Biokit	Wiener
IFI	1				
<i>In house</i>	1	1			
Biokit	0,97	0,97	0,97		
Wiener	0,98	0,98	0,98	0,98	
ICT	0,90	0,85	0,85	0,88	0,86

Cuando se incluyeron los resultados obtenidos con los sueros de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas, los índices k se situaron entre 0,89 y 0,98 (Tabla 21). En este caso se observó una mayor concordancia cuando se combinaron ELISA *in house* con IFI o ELISA Ortho o ELISA Wiener con las técnicas de ELISA convencionales.

Tabla 21. Evaluación de la concordancia entre las diferentes técnicas serológicas mediante el índice estadístico kappa considerando las muestras de pacientes con diferentes enfermedades infecciosas.

	Ortho	IFI	In house	Biokit	Wiener
IFI	0,97				
In house	0,98	0,98			
Biokit	0,97	0,95	0,96		
Wiener	0,98	0,97	0,98	0,97	
ICT	0,92	0,91	0,90	0,90	0,89

2.1.6-Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en los sueros de pacientes diagnosticados de enfermedad de Chagas

Dado que el principal problema de todos los ensayos convencionales de detección de anticuerpos anti-*T.cruzi* es la reactividad cruzada con los antígenos de *Leishmania*, se decidió valorar la utilidad del ensayo IFI *Leishmania*-Spot IF (Biomerieux) en el diagnóstico diferencial con esta enfermedad.

Con este ensayo fueron positivos 34 (37,4%) de los 91 sueros de pacientes infectados por *T. cruzi* a los que se les realizó el test (Figura 17). Más del 50% de los sueros (24/34) presentaron títulos de anticuerpos anti-*Leishmania* en el límite de la positividad (1/80).

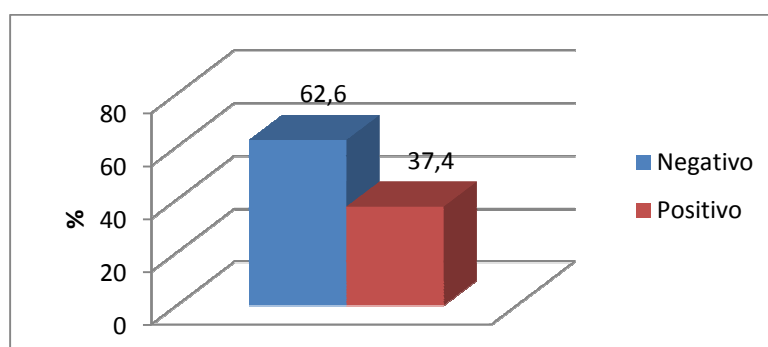


Figura 17. Detección de anticuerpos anti-*Leishmania* en sueros de pacientes infectados por *T. cruzi*.

2.2. Diagnóstico mediante ELISA empleando el péptido sintético 3973

2.2.1-Reconocimiento del péptido sintético 3973 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica sin tratamiento previo

El estudio del reconocimiento del péptido sintético 3973 se realizó en 66 muestras de suero de pacientes adultos con enfermedad de Chagas, y 20 muestras de suero de individuos seronegativos. Todos los pacientes con enfermedad de Chagas se encontraban en fase crónica, y se clasificaron según la forma clínica de la enfermedad en: Chagas crónico asintomático (IND, n: 36), Chagas crónico cardíaco (CCC, n: 20), Chagas crónico cardíaco-digestivo (CCCDIG, n: 6) y Chagas crónico digestivo (DIG, n: 4). Además se incluyeron muestras de suero con enfermedades infecciosas diferentes a Chagas (*Leishmania* n: 4, *Plasmodium* n: 8, virus del dengue n: 1, *Schistosoma* n: 1).

Se escogió el péptido 3973 de *T. cruzi* por observar en cribados preliminares la presencia de antígenos inmunodominantes que son reconocidos en muestras de suero de pacientes con infección por *T. cruzi*.

Como se muestra en la Figura 18, el péptido 3973 es reconocido con significado estadístico ($p<0,001$) por los sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, frente a sueros de individuos seronegativos a diferentes diluciones y tiempos de lectura de la absorbancia. En el caso de los sueros de pacientes con otras enfermedades infecciosas, también obtenemos significación estadística al compararlos con los sueros de los pacientes seropositivos.

La sensibilidad del péptido, independientemente de la dilución empleada y del tiempo en el que se realizó la lectura de absorbancia, fue de 98,5% (IC 95%: 90,7-99,9) (Tabla 22). No ocurre lo mismo en el caso de la especificidad, esta varía del 70,5 al 97% en función de la dilución y tiempo empleado en la lectura. La alta especificidad (97%) del péptido 3973 en los sueros de los pacientes crónicos a diluciones de 1/1600 se debe

fundamentalmente a que sólo uno de los sueros de pacientes con *Leishmania* reconoció este péptido (Figura 18).

Tabla 22. Sensibilidad y especificidad del péptido sintético 3973 en función de la dilución de la muestra y tiempo en el que se realiza la lectura de la absorbancia.

	1/400		1/1600	
	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)	Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)
5 min	98,5 (90,7-99,9)	88,2 (71,6-96,1)	98,5 (90,7-99,9)	97 (82,9-99,8)
7 min	98,5 (90,7-99,9)	70,5 (52,3-84,3)	98,5 (90,7-99,9)	97 (82,9-99,8)

Para saber si la reactividad frente al péptido 3973 podría correlacionarse con las distintas fases de la enfermedad, determinamos la presencia de anticuerpos en pacientes que presentaban diferentes formas clínicas de la infección.

Al analizar los datos de reactividad en función del estadio clínico de la enfermedad de Chagas, se observó que los sueros de los pacientes pertenecientes a los grupos IND, CCC, CCCDIG y DIG, reconocían con significado estadístico ($p<0,001$) el péptido 3973 al compararlo con los sueros de los pacientes seronegativos (Figura 19). Sin embargo, no observamos diferencias estadísticamente significativas al comparar los diferentes estadios de la enfermedad entre sí.

Este péptido es reconocido por los sueros de los pacientes con enfermedad de Chagas independientemente del estadio de la enfermedad.

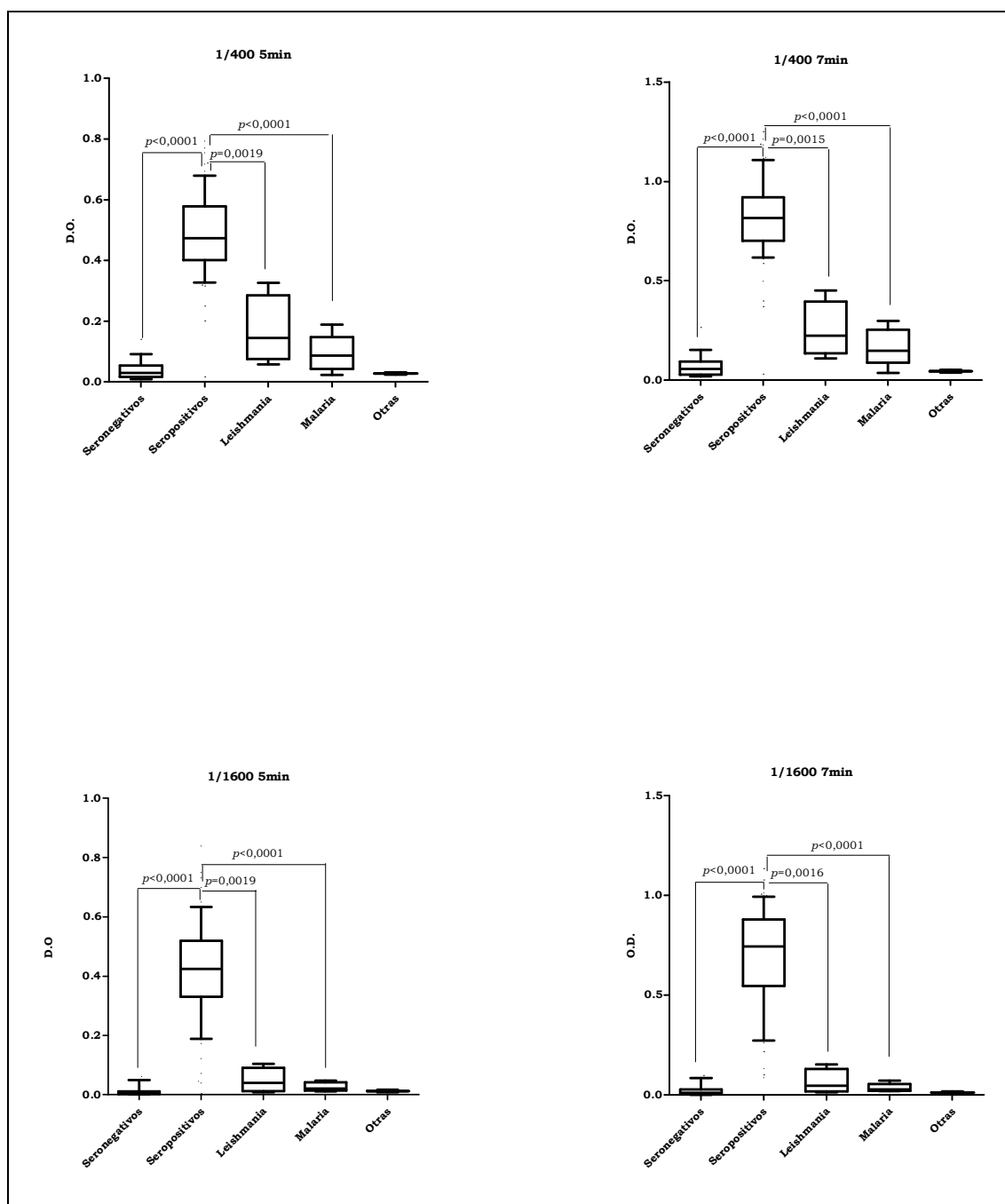


Figura 18. Especificidad de los anticuerpos IgG frente al péptido 3973 a distintas diluciones y tiempos en diferentes grupos de pacientes. Los valores de D.O. correspondientes al porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y 75% son representados como rectángulos verticales y su mediana como una línea horizontal dentro de los mismos. Las barras de error representan intervalos de 10% y 90%.

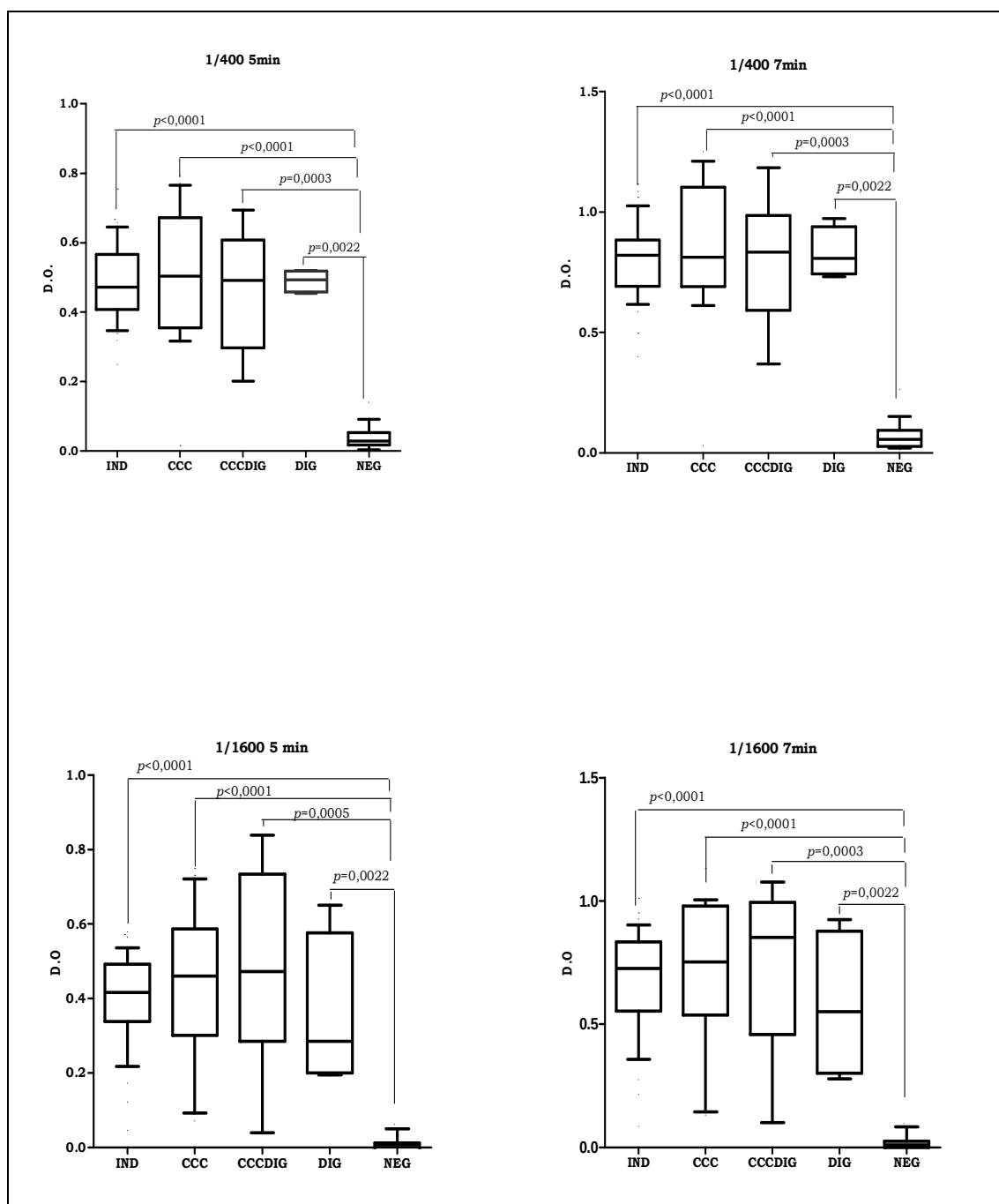


Figura 19. Especificidad de los anticuerpos IgG frente al péptido 3973 a diferentes diluciones y tiempos en pacientes diagnosticados de Chagas en distintos estadios de la enfermedad. Los valores de D.O. correspondientes al porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y 75% son representados como rectángulos verticales y su mediana como una línea horizontal dentro de los mismos. Las barras de error representan intervalos de 10% y 90%.

Curvas ROC (Receiver Operating Characteristic)

El análisis de la curva ROC realizado con los valores de ELISA obtenidos en los sueros de los 66 pacientes con enfermedad de Chagas y los 34 muestras de pacientes sanos y con enfermedad diferente a Chagas, señala la alta capacidad discriminante de la técnica desarrollada, con un área comprendida bajo la curva (ABC) próxima a la unidad en todos los casos (Figura 20).

En la figura la línea de puntos expresa la nula capacidad de discriminación. Cuanto más se acerque la curva al extremo superior izquierdo del cuadro, la prueba diagnóstica tendrá mayor capacidad de discriminación (Zweig y Campbell, 1993).

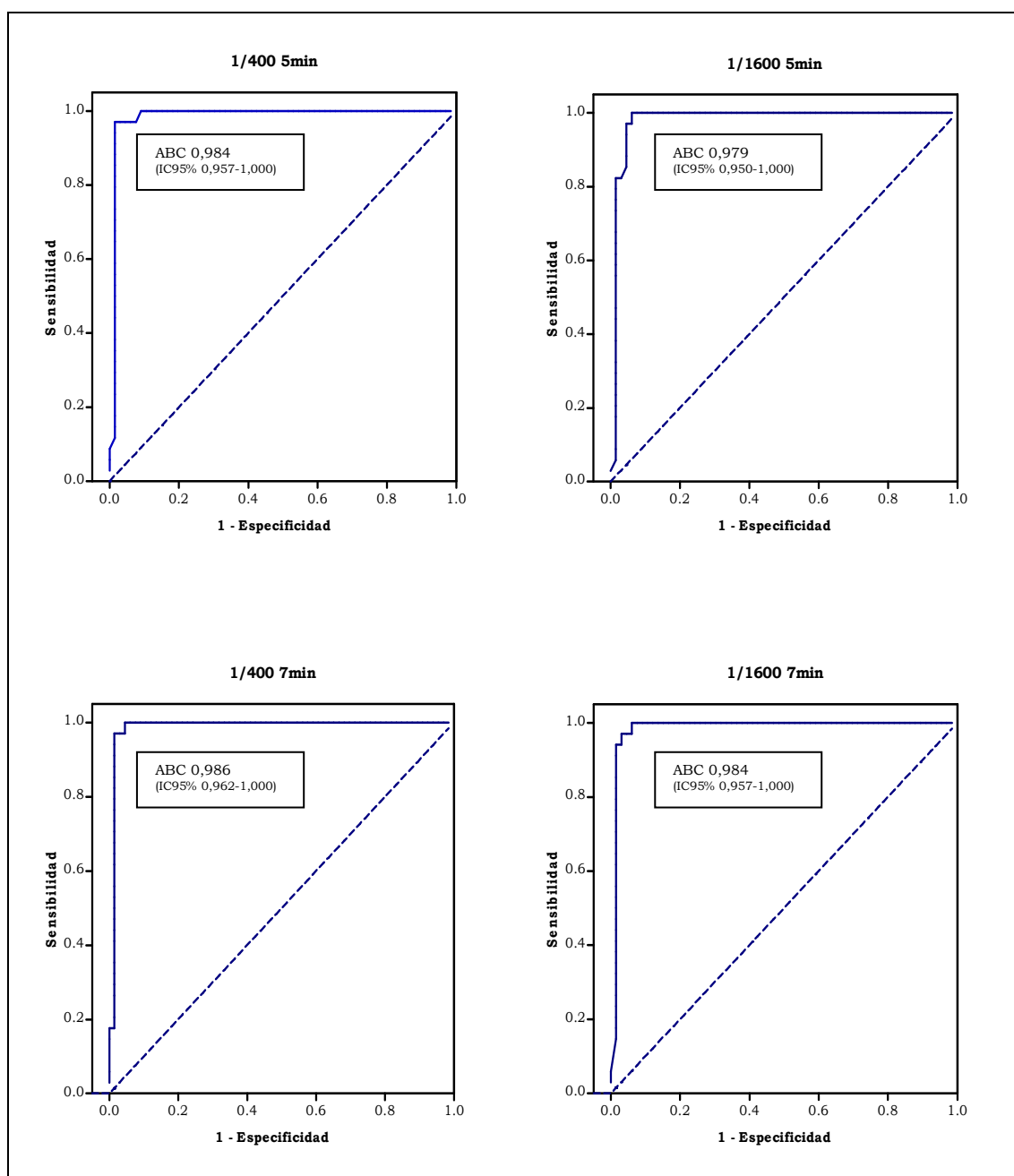


Figura 20. Área Bajo la Curva (ABC) ROC obtenida para el péptido 3973 a distintas diluciones de las muestras y tiempos de lectura de la absorbancia. Se considera como valor aceptable de discriminación $ABC > 0,7$.

2.2.2-Reconocimiento del péptido sintético 3973 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica con tratamiento previo con benznidazol

Tras dos años de haber recibido tratamiento con benznidazol (5 mg/kg/día durante 60 días), se volvió a estudiar el reconocimiento del péptido 3973 en muestras de suero de los mismos 66 pacientes, para evaluar el posible efecto del tratamiento en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Como se muestra en la Figura 21, el péptido 3973 es reconocido con significado estadístico ($p<0,001$) por los sueros de los pacientes tratados, frente a sueros de individuos seronegativos a diferentes diluciones y tiempos de lectura.

La sensibilidad y especificidad del péptido tras haber recibido tratamiento el paciente, sigue siendo la misma que la obtenida en las muestras previas al inicio del tratamiento con benznidazol (Tabla 22).

En cuanto a la reactividad en función del estadio clínico de la enfermedad de Chagas, el péptido 3973 continua siendo reconocido con significado estadístico ($p<0,001$) por los sueros de los pacientes tratados frente a sueros de individuos seronegativos (Figura 22), excepto en el caso de los pacientes con Chagas crónico digestivo ($p=0,13$) a la dilución 1/1600 y tiempo de lectura de la absorbancia 5 minutos.

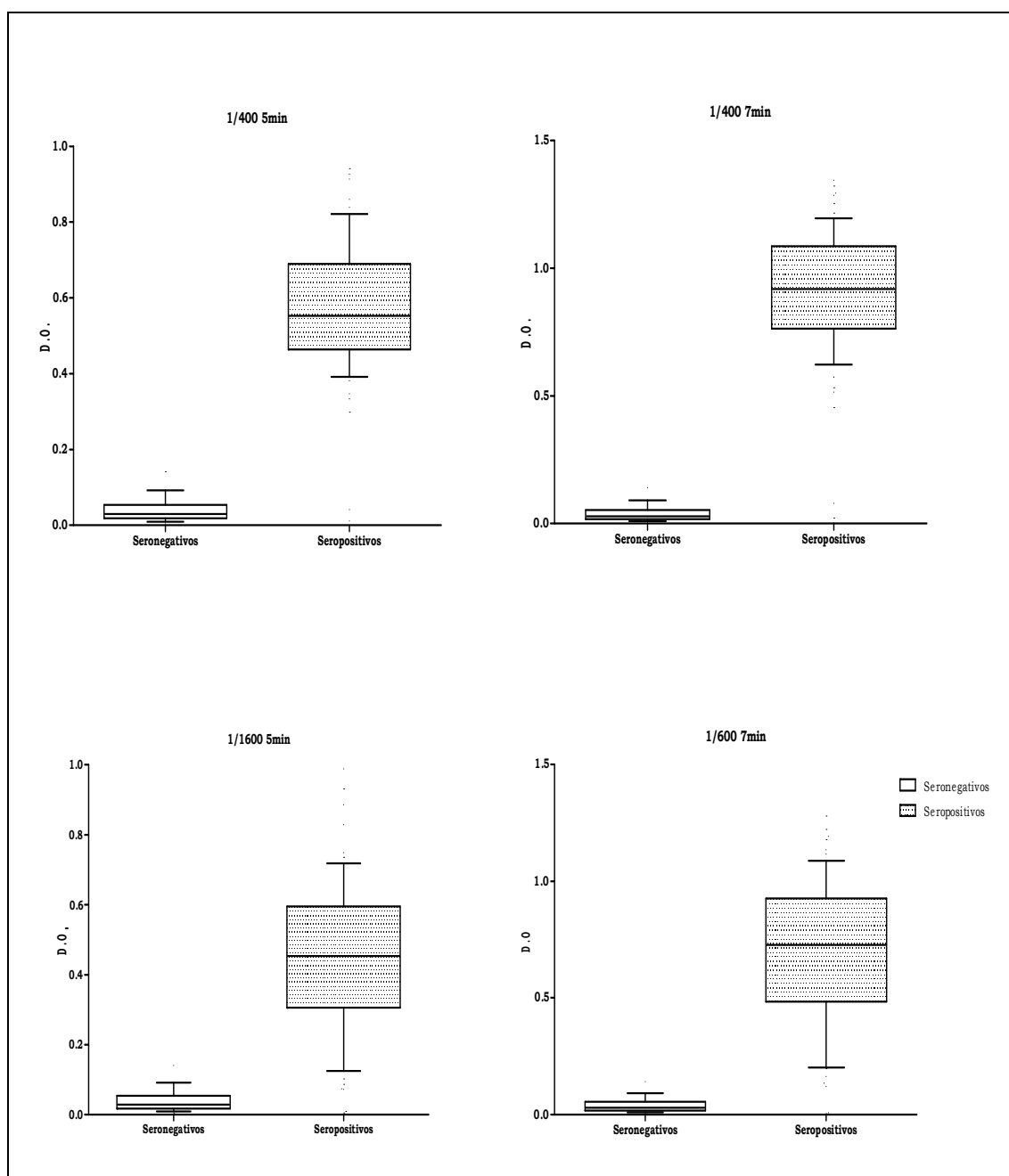


Figura 21. Especificidad de los anticuerpos IgG frente al péptido 3973 a distintas diluciones y tiempos en pacientes seropositivos tratados previamente. Los valores de D.O. correspondientes al porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y 75% son representados como rectángulos verticales y su mediana como una línea horizontal dentro de los mismos. Las barras de error representan intervalos de 10% y 90%.

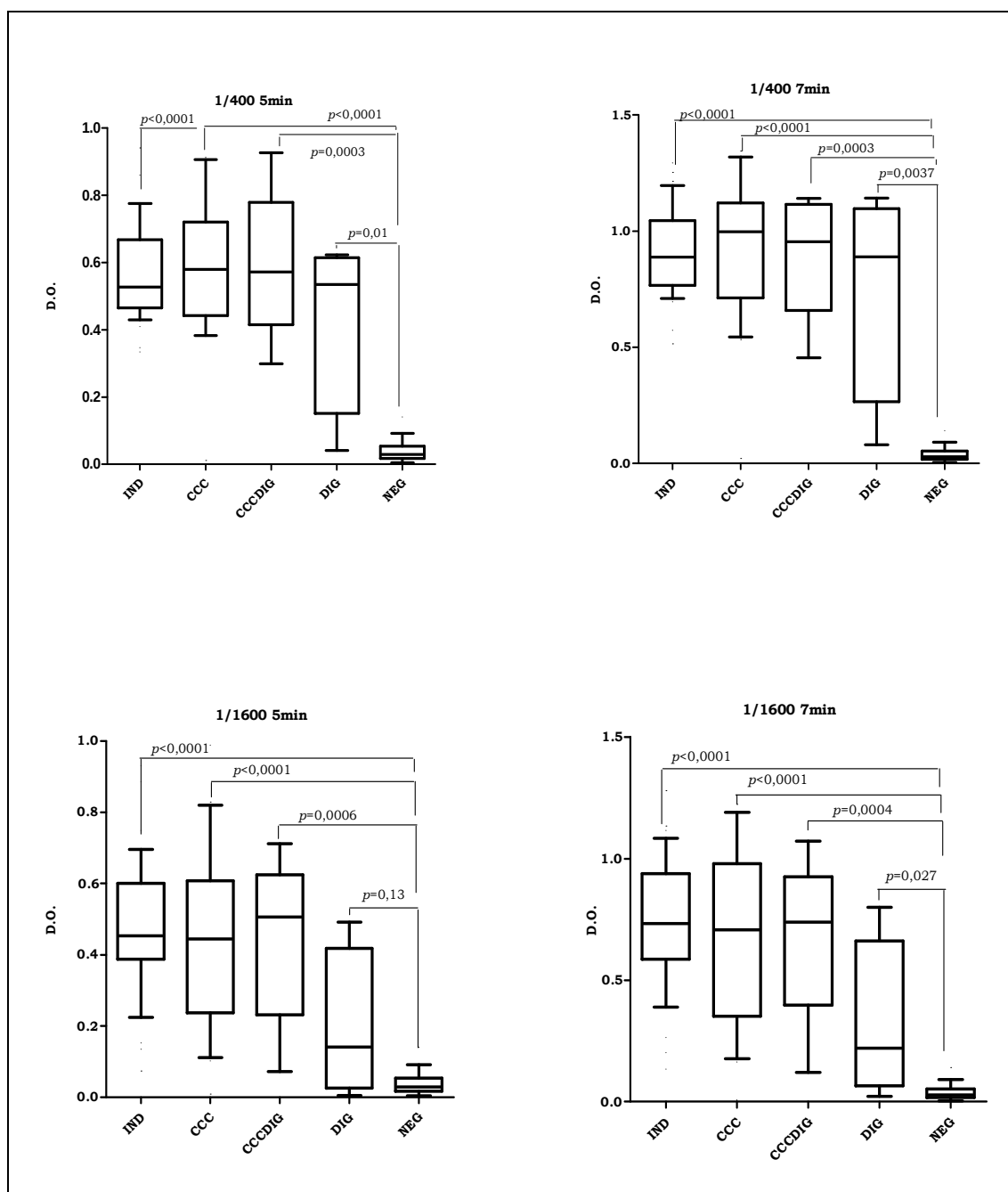


Figura 22. Especificidad de los anticuerpos IgG frente al péptido 3973 a diferentes diluciones y tiempos en pacientes diagnosticados de Chagas previamente tratados en distintos estadios de la enfermedad. Los valores de D.O. correspondientes al porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y 75% son representados como rectángulos verticales y su mediana como una línea horizontal dentro de los mismos. Las barras de error representan intervalos de 10% y 90%.

2.2.2.1- Cambios en la respuesta antígeno específica frente al péptido sintético 3973 tras el tratamiento con benznidazol

Para comprobar el posible efecto que un tratamiento previo puede producir en el patrón de reconocimiento del péptido 3973, comparamos los resultados obtenidos en los 66 pacientes, antes del inicio del tratamiento con benznidazol y 2 años después de haberlo finalizado.

Observamos que la reactividad frente al péptido se mantiene en los mismos niveles en las muestras a la dilución 1/1600 y lectura de absorbancia 7 minutos ($p=0,13$), mientras que en el resto de diluciones y lecturas de absorbancias, aumenta con significado estadístico al cabo de 2 años de haber finalizado el tratamiento (Figura 23).

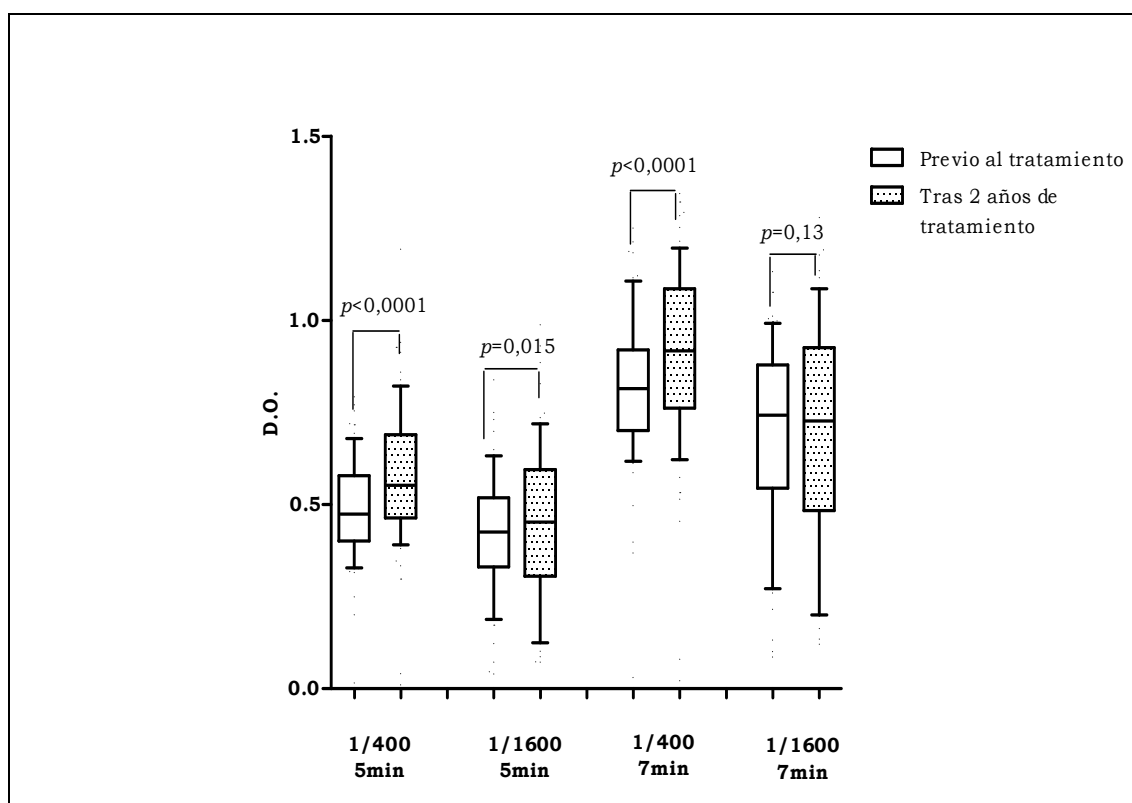


Figura 23. Efecto del tratamiento con benznidazol en el reconocimiento del péptido 3973 a distintas diluciones y tiempos.

Al analizar la respuesta antígeno-específica en función del estadio de la enfermedad, observamos diferencias en función de la dilución de muestra empleada y el tiempo de lectura de la absorbancia (Figura 24).

Así, con una dilución de 1/400 y lectura de absorbancia a los 5 minutos, vemos un aumento de la reactividad estadísticamente significativa en todos los grupos excepto en el digestivo (DIG). Si aumentamos el tiempo de lectura a 7 minutos, no encontramos diferencias significativas en los grupos cardíaco digestivo (CCCDIG) y digestivo (DIG).

Al utilizar la dilución de la muestra 1/1600, independientemente del tiempo de lectura de la absorbancia (5 o 7 minutos), sólo encontramos diferencias estadísticamente significativas en el grupo de pacientes en estadio indeterminado (IND).

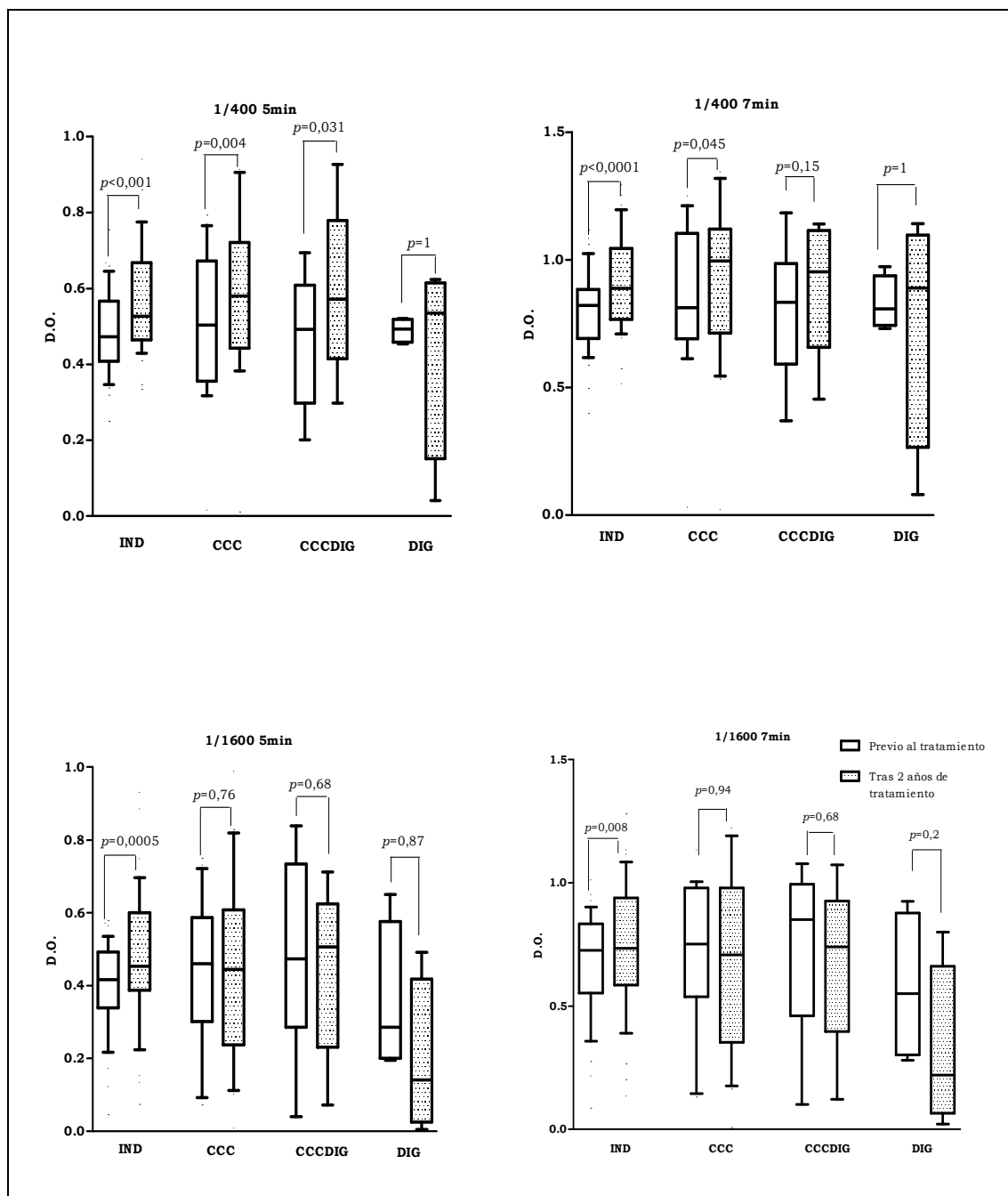


Figura 24. Efecto del tratamiento con benznidazol en el reconocimiento del péptido 3973 a diferentes diluciones y tiempos en pacientes con enfermedad de Chagas en distintos estadios de la enfermedad.

2.3. Evaluación de un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Realizamos un estudio aleatorio con 165 muestras procedentes de la rutina asistencial. Del total de las 165 muestras analizadas, siguiendo los criterios establecidos en este estudio, 89 (54%) fueron negativas y 76 (46%) positivas. 4 muestras tuvieron un resultado discordante entre ELISA e IFI. A estas muestras se les realizó la PCR siendo en todos ellos el resultado negativo, y una técnica inmunocromatográfica siendo en todas el resultado positivo. Con ninguna de las técnicas obtuvimos resultados indeterminados.

El ensayo CMIA fue capaz de detectar 76 de 76 muestras con anticuerpos anti-*T. cruzi*, mostrando una sensibilidad del 100% (Tabla 23). En el caso de las muestras con resultado negativo, detectó 86 de las 89 muestras, presentando una especificidad de 96,6%. 3 muestras negativas fueron débilmente positivas por esta técnica, con valores de S/CO de 1.39, 1.65 y 1.7 respectivamente.

Tabla 23. Reactividad de los sueros, sensibilidad y especificidad de las pruebas empleadas para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*.

Método serológico	Resultados		Sensibilidad (IC 95%)	Especificidad (IC 95%)
	Negativo	Positivo		
Ortho	89	76	100 (94-100)	100 (94-100)
IFI	93	72	94 (86-98)	100 (94-100)
CMIA	86	79	100 (94-100)	96 (89-99)

La distribución de los valores de S/CO en las muestras con anticuerpos anti-*T. cruzi* en el ensayo CMIA, indica que incluso las muestras menos reactivas están por encima del punto de corte establecido (Figura 25).

La media de S/CO de las muestras negativas fue 0.083 para el ensayo CMIA frente a 0.100 en el ELISA, ambas similares y muy por debajo del punto de corte.

El índice de concordancia del ensayo CMIA con las técnicas ELISA e IFI fue de 0,96 (IC 95%: 0,92-1) y 0,91 (IC 95%: 0,85-0,97), respectivamente

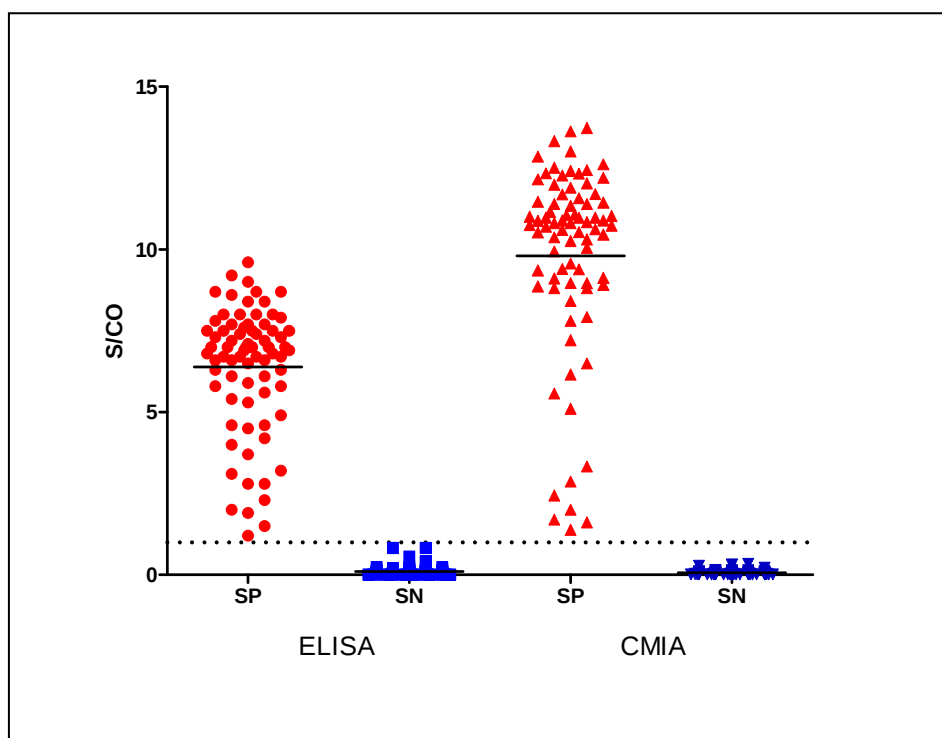


Figura 25. Comparación de los niveles de anticuerpos en las técnicas ELISA y CMIA. La línea horizontal dentro de cada grupo indica la media aritmética. La línea horizontal discontinua a 1: CO. (SP: pacientes seropositivos; SN: pacientes seronegativos; CO: cut-off “punto de corte”; DO: densidad óptica).

3- Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad de Chagas

Se incluyeron un total de 86 pacientes en el presente estudio. De estos pacientes, 66 (75,8%) eran pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica (24 hombres y 42 mujeres, media de edad 36 años, rango 9- 74) y 20 (23,2%) eran pacientes sin enfermedad de Chagas (4 hombres y 16 mujeres, media de edad 26 años, rango 1-54).

El 93,9% (62/66) de los pacientes con enfermedad de Chagas eran de nacionalidad boliviana, y el 84,8% (56/66) residía en zona rural en su país de origen.

El total de la prevalencia de la infección por *H. pylori* no fue significativamente mayor ($p=0,25$) en los pacientes con enfermedad de Chagas (78,8%, 52/66) que en los pacientes sanos (70%, 14/20). Tampoco observamos diferencias ($p>0,05$) al comparar la prevalencia de la infección en función del grupo de edad (Tabla 24).

Tabla 24. Seroprevalencia de *H. pylori* en pacientes con enfermedad de Chagas y pacientes sanos en función del grupo de edad.

Grupo de edad	Chagas + n/total (%)	Chagas - n/total (%)	
≤19	1/1 (100%)	3/6 (50%)	$p=1$
20-29	12/17 (70,6%)	3/3 (100%)	$p=0,53$
30-49	35/41 (85,4%)	5/8 (62,5%)	$p=1$
≥50	4/7 (57,2%)	3/3 (100%)	$p=0,47$

Cuando comparamos la seroprevalencia de *H. pylori* en los pacientes con enfermedad de Chagas que residían en zona rural frente a los que residían en zona urbana, no encontramos diferencias estadísticamente

significativas ($p=0,2$), y lo mismo ocurre cuando los comparamos por grupos de edad (Tabla 25).

Tabla 25. Seroprevalencia de *H. pylori* en pacientes con enfermedad de Chagas según la zona habitual de residencia en su país de origen en función del grupo de edad.

Grupo de edad	Zona rural n/total (%)	Zona urbana n/total (%)	
≤19	0	1/1 (100%)	-
20-29	11/16 (68,7%)	1/1 (100%)	$p=1$
30-49	31/34 (91,2%)	4/7 (57,1%)	$p=0,051$
≥50	4/6 (66,7%)	0/1 (0%)	$p=0,42$

Entre los 66 pacientes con enfermedad de Chagas, 36 (54,5%) se encontraban en la fase indeterminada de la enfermedad, 20 (30,3%) tenían cardiopatía crónica chagásica, 6 (9%) la forma cardiodigestiva y 4 (6%) la forma digestiva.

La prevalencia de infección de *H. pylori* en función de la forma clínica de la enfermedad de Chagas crónica (Figura 26) fue de 83,3% (30/36) en el grupo de pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad, 70% (14/20) en aquellos que presentaban la forma cardíaca, 83,3% (5/6) en los que tenían la forma cardiodigestiva, y 75% (3/4) en los pacientes con forma digestiva. No se pudo establecer una asociación estadísticamente significativa entre *H. pylori* y la forma clínica de la enfermedad de Chagas ($p>0,05$).

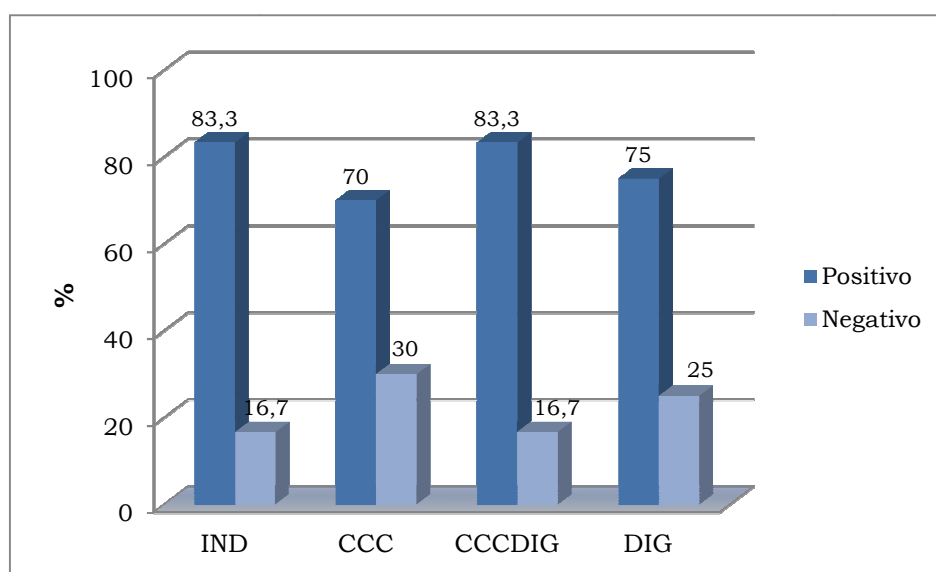


Figura 26. Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* según la forma clínica de la enfermedad de Chagas crónica.

No hubo diferencias significativas ($p=0,20$) en las concentraciones de anticuerpos IgG anti-*H. pylori* entre los pacientes con enfermedad de Chagas (media, 129,2 U/mL) y los pacientes sanos (media, 107,8 U/mL). La media de concentración de anti-*H. pylori* fue similar ($p=0,39$) entre los grupos de pacientes con forma clínica indeterminada (137 U/mL), cardíaca (129 U/mL), digestiva (132 U/mL) y cardiodigestiva (82 U/mL).

3.1- Especificidad del péptido sintético 3973 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y coinfección con *Helicobacter pylori*

Dada la elevada prevalencia de infección por *H. pylori* en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas (78,8%), estudiamos el posible efecto que la infección por *H. pylori* pudiera tener en la respuesta antígeno específica frente al péptido sintético 3973 empleado para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*.

No encontramos diferencias significativas ($p=0,5$) entre los grupos de pacientes con enfermedad de Chagas e infección por *H. pylori* y pacientes con enfermedad de Chagas sin infección por *H. pylori* (Figura 27).

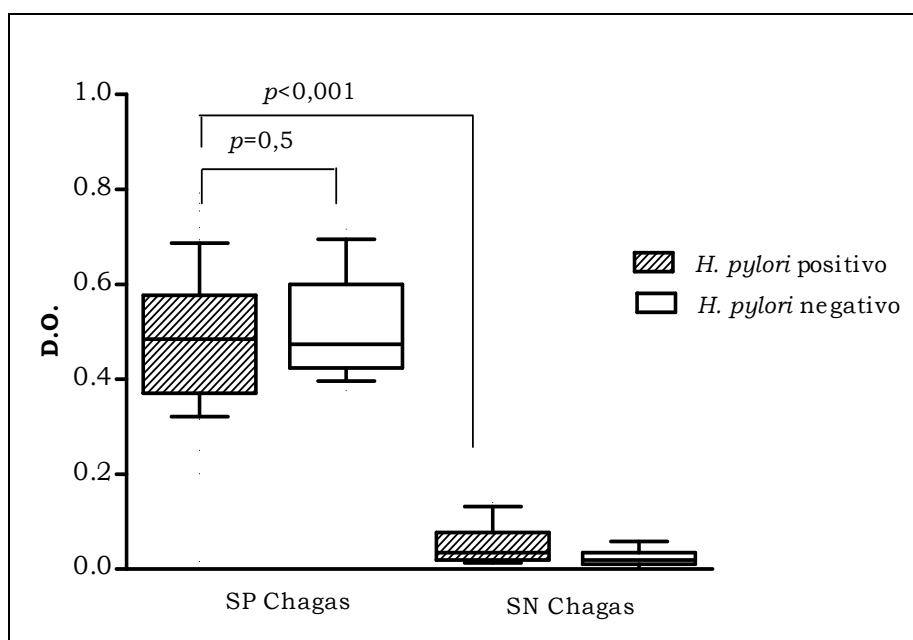


Figura 27. Especificidad de los anticuerpos IgG frente al péptido 3973 en pacientes con enfermedad de Chagas e infección por *Helicobacter pylori*. Los valores de D.O. correspondientes al porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y 75% son representados como rectángulos verticales y su mediana como una línea horizontal dentro de los mismos. Las barras de error representan intervalos de 10% y 90%.

4- Seroprevalencia de helmintiasis en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica

4.1- Geohelminthos y *Schistosoma*

Para el estudio de seroprevalencia de *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* y *Schistosoma mansoni* se emplearon 86 muestras de suero (66 pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica y 20 pacientes sin enfermedad de Chagas) de la cohorte de pacientes del estudio de seroprevalencia de *H. pylori*.

En los pacientes con enfermedad de Chagas, el 77,3% (51/66) presentaba anticuerpos frente a uno o más parásitos de los estudiados; el 100% (51/51) tenía anticuerpos frente *A. lumbricoides*, en el 27,4% (14/51) se detectaron anticuerpos frente a *S. stercoralis* y en el 5,8% (3/51) anticuerpos frente a *S. mansoni* (Figura 28). El 70% (36/51) mostraba anticuerpos sólo frente *A. lumbricoides*, mientras que el resto manifestaba asociaciones de diferentes parásitos, siendo la más frecuente *A. lumbricoides* y *S. stercoralis* (23,5%, 12/51).

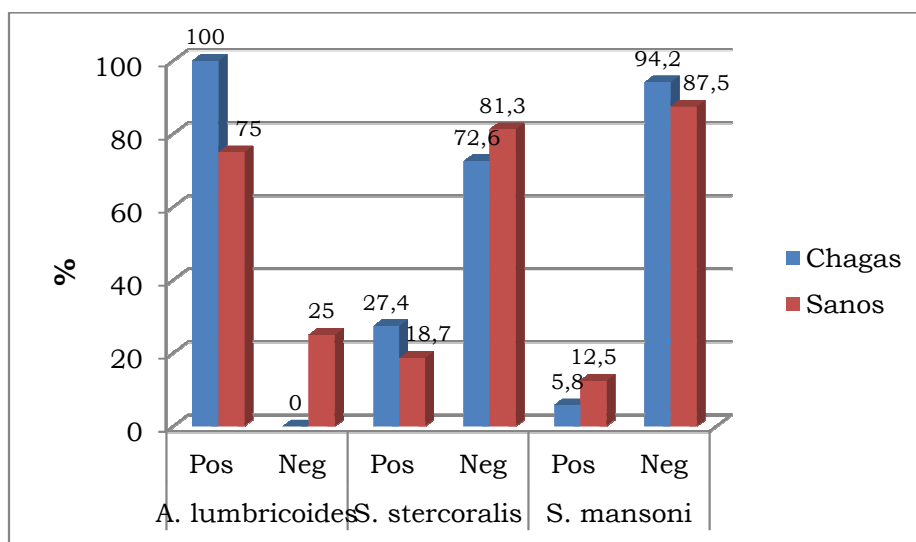


Figura 28. Distribución de los distintos helmintos (*A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *S. mansoni*) en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica y pacientes sanos.

Entre los pacientes seronegativos para *T. cruzi*, la prevalencia total fue del 80% (16/20); el 75% de estos pacientes (12/16) tenía anticuerpos frente *A. lumbricoides*, el 18,7% (3/16) anticuerpos frente a *S. stercoralis* y el 12,5% (2/16) anticuerpos frente a *S. mansoni*. El 56,3% (9/16) mostraba anticuerpos sólo frente *A. lumbricoides*, mientras que el resto manifestaba asociaciones de diferentes parásitos, siendo la más frecuente *A. lumbricoides* y *S. stercoralis* (18,8%, 3/16).

No hubo diferencias significativas en las prevalencias de las infecciones de los diferentes helmintos en los pacientes con enfermedad de Chagas y en los pacientes sanos ($p=0,75$) (Tabla 26).

Tabla 26. Prevalencia de las infecciones de los diferentes helmintos en los pacientes con enfermedad de Chagas y en los pacientes sanos.

	Pacientes con enfermedad de Chagas (n:66)	Pacientes sanos (n:20)
<i>A. lumbricoides</i>	51 (77,3%)	11 (55,1%)
<i>S. stercoralis</i>	14 (21,2%)	3 (14,3%)
<i>S. mansoni</i>	3 (4,5%)	2 (9,5%)

Así mismo, tampoco se establecieron diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$) entre los pacientes con enfermedad de Chagas que procedían de zonas rurales (76,7%, 43/56), y aquellos que procedían de zonas urbanas (80%, 8/10).

Las seroprevalencias de infección por los diferentes parásitos en función de la forma clínica de la enfermedad de Chagas crónica fue de 83% (*A. lumbricoides*), 22,2% (*S. stercoralis*) y 5,5% (*S. mansoni*) en el grupo de pacientes con la forma indeterminada de la enfermedad; 70% (*A. lumbricoides*), 30% (*S. stercoralis*) y 0% (*S. mansoni*) en aquellos que presentaban la forma cardíaca; 66,6% (*A. lumbricoides*), 0% (*S. stercoralis*) y 16,6% (*S. mansoni*) en los que tenían la forma cardiodigestiva, y 75% (*A.*

lumbricoides), 0% (*S. stercoralis*) y 0% (*S. mansoni*) en las formas digestivas (Figura 29). No se pudo establecer una asociación estadísticamente significativa entre los diferentes helmintos (*A. lumbricoides*, *S. stercoralis*, *S. mansoni*) y la forma clínica de la enfermedad de Chagas ($p>0,05$).

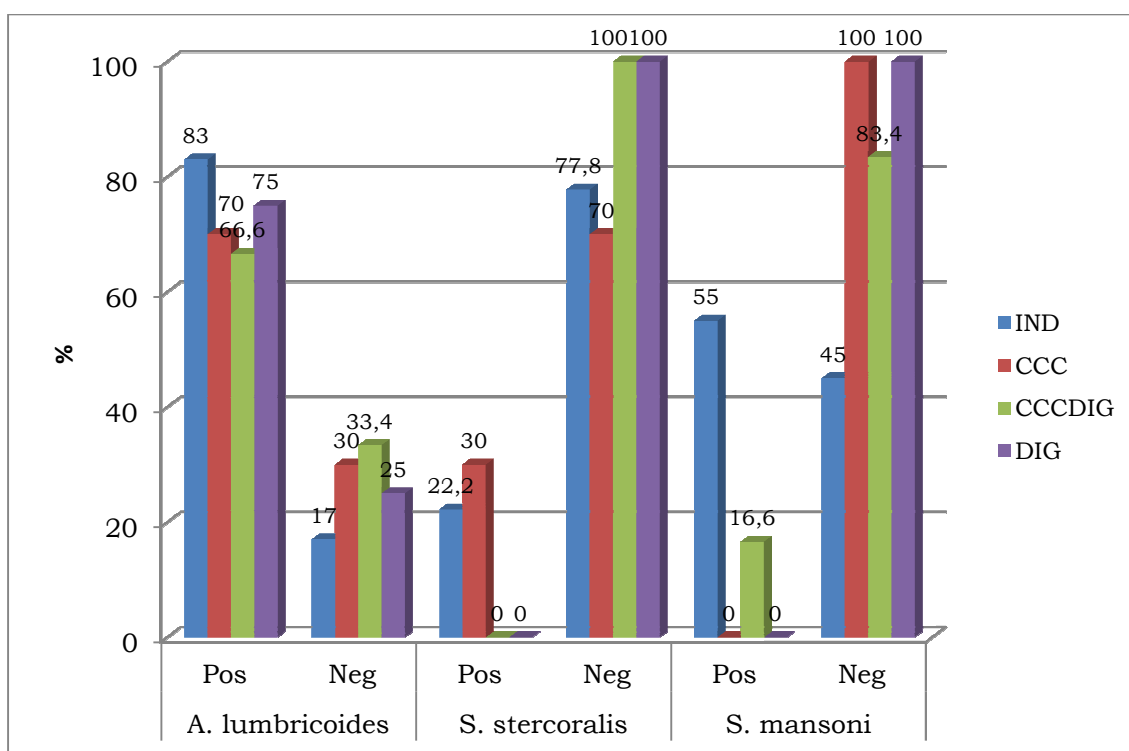


Figura 29. Seroprevalencias de las diferentes helmintosis en función de la forma clínica de la enfermedad de Chagas.

4.1.1- Especificidad del péptido sintético 3973 en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y coinfección con helmintos

Dada la elevada prevalencia de infección por geohelminthos en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas, estudiamos el posible efecto que pudiera tener la coinfección con helmintos, en el empleo del péptido sintético 3973 para el diagnóstico serológico de dicha enfermedad.

No encontramos diferencias significativas ($p=0,57$) entre los grupos de pacientes con enfermedad de Chagas e infección con algún helminto (*A. lumbricoides*, *S. stercoralis* y *S. mansoni*) y pacientes con enfermedad de Chagas sin infección por estos (Figura 30).

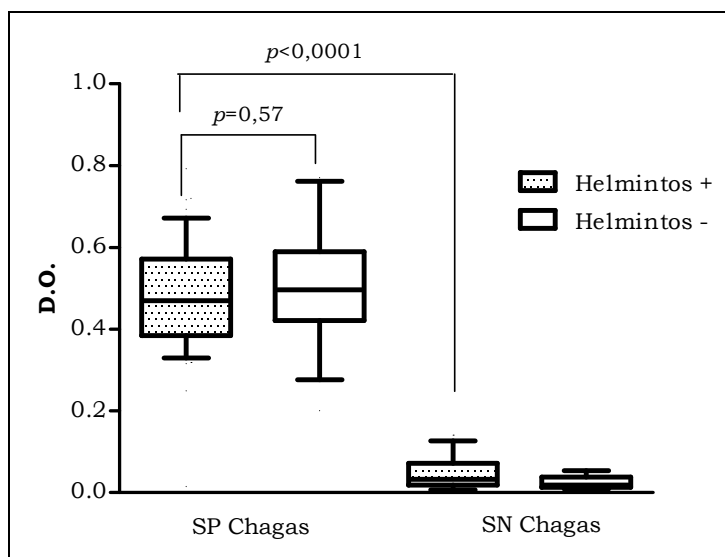


Figura 30. Especificidad de los anticuerpos IgG frente al péptido 3973 en pacientes con enfermedad de Chagas e infección por uno o más helmintos (*Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis* y *Schistosoma mansoni*). Los valores de D.O. correspondientes al porcentaje de pacientes comprendidos entre el 25% y 75% son representados como rectángulos verticales y su mediana como una línea horizontal dentro de los mismos. Las barras de error representan intervalos de 10% y 90%.

4.2- *Trichinella spiralis*

En el estudio de detección de anticuerpos frente a *Trichinella spiralis*, se incluyeron 86 muestras de suero (66 pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica y 20 pacientes sin enfermedad de Chagas) de la cohorte de pacientes del estudio de seroprevalencia de *H. pylori*.

En ningún paciente (con o sin enfermedad de Chagas), se detectó la presencia de anticuerpos frente *T. spiralis*.

El aumento de los movimientos migratorios fuera de América Latina ha hecho que una enfermedad endémica del continente americano como es la tripanosomiasis americana, pueda diagnosticarse en cualquier parte del mundo, incluso en países donde no hay transmisión vectorial como EEUU, Canadá o Europa. En estas zonas, además de observarse un aumento progresivo en el número de casos de infección crónica, se puede perpetuar la transmisión de la enfermedad por vías distintas a la vectorial (Schmunis y col., 2005).

España ha sido tradicionalmente, un destino atractivo para la población latinoamericana debido a los vínculos culturales y lingüísticos existentes. En los últimos años se ha producido un aumento exponencial de esta población en nuestro país, lo cual tiene implicaciones de salud pública debido a la posibilidad de transmisión de esta enfermedad por vía sanguínea, por trasplantes de órganos y mediante transmisión vertical.

En 2008, más de 38 millones de inmigrantes residían en Europa, de los cuales el 11% procedía de América Latina (Vasileva, 2009), la mayoría de ellos de Ecuador, Brasil, Colombia y Bolivia. Estos datos no incluyen inmigrantes sin permiso de residencia, gente nacida fuera de Europa que adquiere la nacionalidad de un país europeo, o niños extranjeros adoptados por familias europeas. Esto sugiere, que el número de inmigrantes procedentes de zonas endémicas está infraestimado, y en consecuencia, el número de personas infectadas con *T. cruzi*.

Actualmente, sólo un pequeño número de personas infectadas con *T. cruzi* han sido detectadas en Europa (OMS, 2010). Los principales motivos de este bajo número de detecciones son, la escasa o nula experiencia del personal sanitario en la detección y manejo de la enfermedad de Chagas, el limitado acceso a programas de cribado para las comunidades con alto riesgo, y el retraso en el diagnóstico, ya que en la fase crónica los pacientes pueden permanecer asintomáticos durante años (Rassi y col., 2010).

Existen pocos datos sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas en Europa, en España se estima que en el año 2009, entre 40.000 y 65.000 residentes estaban infectados por *T. cruzi* (OMS, 2010_b), mientras que en otros países europeos el rango estimado oscilaba entre 12.000 y 15.000 (Guerri-Gutemberg y col., 2008).

España es sin duda uno de los países europeos que recibe más inmigrantes procedentes de América Latina, con una desigual distribución en las diferentes comunidades autónomas. Las comunidades con una mayor proporción de inmigrantes latinoamericanos son la Comunidad de Madrid (24,1%), Cataluña (21%) y Comunidad Valenciana (11,4%); por el contrario, las que tienen menor proporción de inmigrantes latinoamericanos son Extremadura (0,5%), La Rioja (0,75%) y Cantabria (0,8%). En la Región de Murcia los datos del avance del Padrón a 1 de enero de 2012 registraron unas cifras de 71.702 personas de este origen (6%), de las cuales 3.708 procedían de América Central, 67.994 de América del Sur, y de estas el 51,2% eran mujeres.

En nuestro trabajo el número de muestras con anticuerpos frente a *T. cruzi* es elevado (46,3%), lo que podría ser un reflejo de la tendencia de que los inmigrantes bolivianos que llegan a Murcia proceden predominantemente de los valles medios de Cochabamba, Chuquisaca y Santa Cruz, donde la prevalencia de infección por *T. cruzi* en población general es >20%. Los datos que obtenemos son superiores a los reflejados en un estudio realizado en Barcelona, donde encuentran una seroprevalencia en inmigrantes latinoamericanos próxima al 37% (Muñoz y col., 2007), y en otro estudio llevado a cabo en Valencia en el que la prevalencia de la enfermedad es del 20,8% (Parada y col., 2007).

No obstante, hay que ser cauteloso a la hora de valorar este dato, ya que estamos hablando de muestras positivas y no de pacientes, y habría que considerar la posibilidad de duplicidad en algunos estudios serológicos.

De la misma manera que existe una distribución desigual de inmigrantes en las Comunidades, dentro de la Región de Murcia también

encontramos zonas con mayores densidades de población inmigrante. Esto queda reflejado en el mayor número de peticiones de estudio de serológico de la enfermedad de Chagas que se produce en el Área de Salud III (Lorca), Área de Salud V (Altiplano) y Área de Salud VI (Vega Media del Segura), con el 8,5%, 9,3% y 8,2% respectivamente, consecuencia probable de una mayor oferta de trabajo en estas zonas. Lógicamente, el Área de Salud I (Murcia/Oeste) es la que con diferencia engloba un mayor número de determinaciones, ya que es donde se encuentra la Unidad de Medicina Tropical.

Un modo importante de infección en nuestro medio, es la transmisión vertical de una madre seropositiva a su hijo durante el embarazo o el nacimiento. Además, el elevado número de mujeres entre los inmigrantes de América Latina (más del 60% son mujeres) hace pensar que la transmisión vertical pueda convertirse en una causa importante de preocupación (Soriano y col., 2009). En un estudio realizado en 1.350 mujeres embarazadas en Barcelona, la seroprevalencia total fue del 3,4%, pero esta aumentaba al 27,7% en el caso de mujeres de origen boliviano, estimándose que el porcentaje de transmisión madre-hijo en esta población es del 7,3% (Muñoz y col., 2009). En otro estudio realizado en Murcia, la tasa de transmisión vertical estimada fue superior, alcanzando el 13,8% (Murcia y col., 2013).

En nuestro caso, casi un 60% de las muestras corresponden a mujeres, de las que un 80,3% están en edad fértil (15-45 años), y más de la mitad (51,2%) tienen anticuerpos frente a *T. cruzi*.

La mayoría de las infecciones congénitas por *T. cruzi* en países no endémicos no son reconocidas, ya que un alto porcentaje de estos niños no desarrollan ninguna sintomatología. Si estos niños no se diagnostican, la enfermedad progresará a crónica, con las implicaciones económicas y sociales que ello conlleva. En el caso de la infancia, el tratamiento farmacológico tiene tasas de curación próximas al 100%, lo que pone de manifiesto la importancia de un diagnóstico temprano.

Actualmente, en España no existe una política nacional que establezca monitorizar la enfermedad de Chagas en embarazadas y recién nacidos. Sólo la Comunidad Valenciana y Cataluña, tienen regulaciones al respecto y realizan sistemáticamente cribados desde noviembre del 2007 y febrero del 2009, respectivamente (Generalitat Valenciana, 2009; Generalitat de Catalunya, 2010). Hasta la fecha, se han descrito casos de infección congénita en la Comunidad Valenciana, Cataluña, Región de Murcia, Aragón, País Vasco y Andalucía (OMS, 2010_b).

En estos momentos, la única manera de controlar la enfermedad de Chagas en embarazadas es determinando la presencia de anticuerpos frente a *T. cruzi* en aquellas mujeres procedentes de zonas donde la infección es endémica; además, la detección de anticuerpos facilita el realizar un diagnóstico y administrar tratamiento precozmente en los casos de infección congénita, así como tratar a la madre después del parto, para reducir el riesgo de transmisión en futuros embarazos.

En España, tanto las mujeres embarazadas como el resto de la población latinoamericana procedente de países endémicos se encuentran en la etapa crónica. El diagnóstico, el manejo y el tratamiento de esta población permitirán controlar y reducir la transmisión por transfusión sanguínea y congénita.

Diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica

Desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio, la infección por *T. cruzi* es una entidad compleja, en la que su evolución natural marca la eficacia del diagnóstico parasitológico y serológico. Para realizar un diagnóstico de laboratorio apropiado es recomendable conocer la información sobre la fase de la infección que se sospecha (Luquetti y Rassi, 2000). Es decir, si se trata de una infección aguda o reciente, es conveniente emplear todas las herramientas que permitan detectar al parásito. Sin embargo, el 98% de los afectados se diagnostica en la fase crónica. En esta fase, la herramienta que permite demostrar la infección por este protozoo es, principalmente, la determinación de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* específicos. El conjunto de los resultados de ambas

aproximaciones permitirá valorar con mayor precisión la evolución del individuo.

En la infección crónica, ninguna muestra es totalmente idónea para la detección directa del parásito. Si bien *T. cruzi* en esta etapa se localiza preferentemente en tejidos, una biopsia no asegura ni mejora la sensibilidad de las técnicas parasitológicas. Por ello, la sangre es la muestra menos invasiva. Hay que tener en cuenta, que algunos enfermos en fase crónica tienen parasitemias persistentes, pero en la mayoría es posible que se alternen resultados positivos con negativos. Mientras un resultado parasitológico positivo confirma la infección, un resultado parasitológico negativo con serología positiva no necesariamente indica ausencia de parásitos.

Las técnicas parasitológicas se emplean de forma excepcional en la fase crónica de la enfermedad de Chagas debido a la habitual baja parasitemia. Es de resaltar, que se obtienen resultados parasitológicos positivos en menos de la mitad de los infectados, dependiendo de la edad y de la región geográfica considerada. En los extremos de la vida (niños y ancianos) la parasitemia suele ser más elevada (Luquetti y Rassi, 2000).

Con el objetivo de visualizar parásitos en número muy bajo, se emplean métodos de concentración (técnica de Strout). Esta técnica es capaz de detectar más del 95% de los casos en fase aguda, mientras que resulta prácticamente imposible detectarlos en la fase crónica de la enfermedad, tal y como comprobamos en nuestro estudio donde no obtuvimos resultados positivos en ninguna de las 107 muestras a las que realizamos la técnica.

Entre la diferentes técnicas parasitológicas empleadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, el hemocultivo se presenta como un método de baja rentabilidad, sobre todo en pacientes en fase crónica, y cuando no se realiza en condiciones óptimas (cultivo de 30 ml de sangre procesada inmediatamente después de la extracción). Aunque este método es muy específico, tiene una baja sensibilidad (50-74%), es una técnica laboriosa y consume mucho tiempo (Junqueira y col., 1996). A diferencia de un

estudio realizado por Castro y colaboradores (2002) donde describen una sensibilidad del hemocultivo en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica del 65% (siempre y cuando se analicen dos muestras del mismo paciente), nuestros resultados reflejan esa baja rentabilidad anteriormente comentada, ya que en ninguno de los 15 pacientes en los que se realizó dicha técnica se pudo aislar el parásito. Estos datos podrían ser debidos por el bajo número de muestras cultivadas, y por el hecho de procesar una única muestra por paciente.

Por lo que respecta a las técnicas de PCR, estas ofrecen muchas ventajas en los casos en los que la parasitemia es baja, bien por estar en fase crónica o por infecciones que cursan con bajas parasitemias. Además, proporciona la herramienta más sensible para el diagnóstico congénito y en fase aguda de la enfermedad de Chagas, y para el diagnóstico de la enfermedad en pacientes inmunodeprimidos en los cuales la producción de anticuerpos es deficiente; también permite el seguimiento de los pacientes con tratamiento. Sin embargo, como todas las técnicas diagnósticas, tiene sus limitaciones, y entre ellas el ser menos sensible en la fase crónica de la enfermedad.

Los trabajos publicados aluden a una sensibilidad de la PCR comparada con los métodos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas que puede variar entre el 59% y el 100% (Wincker y col., 1994). En nuestro caso obtenemos una sensibilidad de la PCR del 65,7%, dato bastante elevado que podría estar relacionado con el hecho de que los pacientes proceden principalmente de Bolivia (96,8% de los pacientes), donde la técnica de PCR tiene una mayor sensibilidad (Wincker y col., 1994). Si tenemos en cuenta el rango de edad, observamos diferentes sensibilidades. La mayor sensibilidad (100%), la obtenemos en los pacientes jóvenes (2-19 años), seguida de los pacientes adultos (69,2%) (20-39 años) y la menor (47,8%) corresponde a los pacientes mayores (>40 años). Al fijarnos en el tiempo de residencia en España, aquellos pacientes que llevan menos tiempo, tienen una mayor porcentaje de PCR positivas (76%), probablemente debido a que ha transcurrido menos tiempo entre la infección y el diagnóstico con la técnica de PCR.

En la infección crónica por *T. cruzi*, la PCR generalmente no es útil como test diagnóstico. Aunque los resultados de la PCR sean positivos en una determinada proporción de pacientes, la sensibilidad es variable dependiendo de las características de la población testada (área geográfica y edad del paciente), así como de una serie de factores técnicos relacionados con el procedimiento (volumen de sangre empleado, condiciones de conservación, método de extracción de ADN, secuencia del parásito y cebadores seleccionados, y condiciones del termociclador) (Schijman y col., 2011). Estas variaciones en cuanto a la sensibilidad, también podrían ser explicadas, en parte, por la presencia intermitente y cantidad de parásito circulante en el momento de la toma de muestra. Además, las dianas moleculares de las cepas pertenecientes a las seis Unidades Discretas de Tipificación (DTUs) de *T. cruzi*, poseen diferentes contenidos de ADN, con polimorfismos de secuencias en los fragmentos amplificados que pueden influir en la eficiencia de la amplificación (Vargas y col., 2004; Ienne y col., 2010). Debido a esto, un resultado negativo por PCR no constituye una evidencia de ausencia de infección.

Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica

En el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en fase crónica, los métodos serológicos continúan siendo las técnicas de referencia. Actualmente, el número de técnicas comerciales que existen en el mercado para la determinación de anticuerpos frente a *T. cruzi* es amplio, por lo que a la hora de elegir una u otra técnica es importante determinar el objetivo del estudio y la infraestructura disponible.

Aunque se han realizado numerosos estudios para evaluar las distintas pruebas de detección de anticuerpos específicos anti-*T. cruzi*, no existe consenso en la elección de una técnica de referencia.

En numerosos trabajos se sugiere que el uso de antígenos recombinantes es la mejor elección para el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (da Silveira y col., 2001; Umezawa y da Silveira, 1999). El origen de la proteína recombinante es el principal tema de controversia, dado que la mayoría de estos péptidos se obtienen del

genotipo *T. cruzi* II, y las cepas que circulan en Bolivia y otras zonas del norte de Sudamérica son predominantemente del genotipo *T. cruzi* I. Los estudios realizados en el Cono Sur de Sudamérica reportan una eficacia elevada de los kits comerciales fabricados en esta región (Caballero y col., 2007; Gomes y col., 2001). En cambio, los trabajos llevados a cabo en el norte de Sudamérica y Centroamérica muestran que la utilización de antígenos preparados a partir de las cepas de *T. cruzi* que se aíslan en estas zonas incrementan la sensibilidad de los ensayos de detección de anticuerpos (Enciso y col., 2004; Sánchez y col., 2001). Este hecho se basa en el predominio del genotipo *T. cruzi* I en estas regiones (Triana y col., 2006; Bosseno y col., 2002) y la amplia extensión del genotipo *T. cruzi* II en los países del Cono Sur (Mieles y col., 2003).

También se ha descrito la existencia de una diferencia en el perfil de inmunoglobulinas entre los diferentes genotipos de *T. cruzi*, factor que podría explicar la menor sensibilidad de algunos de los test disponibles (dos Santos y col., 2009).

Además de la procedencia de las cepas empleadas para la obtención de los extractos, otras posibles causas de discordancia en los resultados obtenidos con las pruebas serológicas son el estadio del parásito utilizado como antígeno (es bien conocido cómo el parásito exhibe antígenos estadio-específicos, muchos de los cuales han sido reconocidos como participantes en los mecanismos de infección y en la respuesta del sistema inmune ante ella), y la preparación del antígeno. Los estudios realizados por Mendes y colaboradores (1997) indican como el proceso de obtención de extractos solubles del parásito, así como las condiciones de centrifugación, afectan profundamente el perfil de antígenos o epítomos reconocidos por los sueros.

En las técnicas de diagnóstico convencional, el antígeno empleado con mayor frecuencia son las formas epimastigotes de *T. cruzi*, así pues estas formas representan el 84% en relación con el uso de las formas tripomastigotes (9%) y las formas amastigotes (7%) (Primavera y col., 1990). Sin embargo, sería más conveniente el empleo de los antígenos tripomastigotes y amastigotes, dado que estos son los estadios que vamos a encontrar en el hospedador vertebrado, es decir, en el enfermo.

Algunos autores que han utilizado como antígenos las formas amastigotes (procedentes del sobrenadantes de cultivos tisulares infectados) en ensayos serológicos, han visto que los anticuerpos específicos muestran una mayor reactividad que con los antígenos procedentes de epimastigotes (Araujo y Guptill, 1984).

De la misma manera, el empleo como antígeno del extracto de la forma tripomastigote, ha demostrado una gran utilidad en regiones donde la enfermedad de Chagas no es endémica (Aznar y col., 1997).

Así pues, en el ELISA *in house* que utilizamos para el diagnóstico de enfermedad de Chaga, empleamos una mezcla de extracto antigénico de las formas tripomastigote y amastigote, obteniendo unos valores de sensibilidad (100%) y especificidad (96,9%) similares a los del resto de los test empleados (convencionales y no convencionales).

Aunque es discutido, también se ha descrito la eliminación espontánea del parásito, curación espontánea (Francolino y col., 2003), en algunos pacientes que no recibieron tratamiento específico.

La complejidad de la interacción de *T. cruzi* con su hospedador, hace que ningún antígeno recombinante por sí solo haya alcanzado la eficacia de los extractos totales en el inmunodiagnóstico de este protozoo. Generalmente, la composición antigénica de los ensayos basados en antígenos recombinantes incluye una combinación de varios epítomos, que incluso suelen ser los mismos (da Silveira y col., 2001).

Debido a los problemas comunes de sensibilidad y especificidad de los ensayos serológicos, ante casos de discrepancia se recomienda el uso de una tercera técnica (Prata, 2001; OMS, 2010b) que pueda considerarse como prueba de referencia. Algunos investigadores plantearon la posibilidad de que las pruebas de antígenos de excreción secreción de tripomastigotes (TESA, *trypomastigotes excreted-secreted antigen*)-blot (Umezawa y col., 1996) o pruebas de radioinmunoprecipitación (RIPA, *radioimmuno-precipitation assay*) (Winkler y col., 1995) se consideraran como tales. Sin embargo, otros autores han demostrado que estas técnicas

también presentan resultados negativos y problemas de reactividad cruzada (Amato-Neto y col., 2005; Chang y col., 2006). Además, debido a las limitaciones técnicas para su comercialización, la utilización de estas herramientas queda restringida a los centros en los que se desarrollaron.

En nuestro estudio incluimos test de ELISA, tanto convencionales (ELISA *in house*, ELISA Ortho) como no convencionales (ELISA Biokit, ELISA Wiener), todos ellos con una sensibilidad del 100%. No encontramos diferencias entre los test que emplean extractos del parásito y los que usan antígenos recombinantes.

Por lo que respecta a la especificidad, todas las pruebas convencionales (ELISA *in house*, ELISA Ortho) obtuvieron valores del 100%, y sólo las pruebas no convencionales presentaron resultados discordantes, con una especificidad del 96% para el ELISA Biokit y del 98% para el ELISA Wiener. En el caso de ELISA Biokit, una posible explicación técnica de la presencia de resultados falsamente positivos, podría deberse a la composición del conjugado, éste contiene anti-IgM además de anti-IgG humana. Si bien algunos autores defienden la utilidad diagnóstica de la evaluación de los anticuerpos IgM (Corral y col., 1998), estos pueden generar resultados discordantes por su amplia reactividad (Boes, 2000). Aunque no podemos descartar una posible infección aguda o reciente (periodo ventana), el número de individuos en este periodo es reducido con respecto a lo que ocurre en zonas endémicas.

Uno de los principales inconvenientes de los ensayos de detección de anticuerpos es la reactividad cruzada. Muchos autores han descrito este problema con los sueros de pacientes con leishmaniosis, malaria y enfermedades autoinmunes entre otras. Por esto, para el estudio de los índices diagnósticos, se recomienda la inclusión de muestras con evidencia serológica de otras enfermedades (Caballero y col., 2007). Según estas recomendaciones, en nuestro trabajo incluimos sueros de individuos con anticuerpos frente a *Leishmania*, *Plasmodium*, *Schistosoma* y virus del dengue.

Observamos como todas las técnicas convencionales (IFI, ELISA Ortho, ELISA *in house*) tienen una disminución considerable en la especificidad con respecto a las no convencionales (Tabla 19). Sin el análisis de la información clínico-epidemiológica muchos pacientes con leishmaniosis podrían diagnosticarse erróneamente como infectados por *T. cruzi*, o se incluirían en la población de individuos con serología discordante (Tabla 16). Por esto, es necesario que además de la valoración de los datos clínico-epidemiológicos, se realice un estudio parasitológico y el seguimiento del individuo a largo plazo.

Las reacciones cruzadas de los pacientes con enfermedad de Chagas y otros microorganismos se conocen bien, y suelen ocurrir principalmente con miembros de la familia *Trypanosomatidae*. Los ensayos que emplean extractos crudos del parásito como antígeno, reaccionan frecuentemente con sueros de individuos infectados con diferentes especies de *Leishmania* o con *Trypanosoma rangeli* (Saldaña y Sousa, 1996).

La discriminación entre enfermedad de Chagas y leishmaniosis es un problema importante en muchas partes de Latinoamérica, ya que ambos patógenos suelen coexistir. Las cepas de *Leishmania* en el Nuevo Mundo (*L. braziliensis*, *L. chagasi*, *L. mexicana*) difieren de las del Viejo Mundo (*L. infantum* y *L. major*). Sin embargo, con excepción de *L. braziliensis*, la información disponible de las secuencias genómicas de las especies del Nuevo Mundo es escasa. A pesar de ello, al comparar la secuencia de *T. cruzi* con *L. braziliensis* (responsable de más del 85% de las leishmaniosis en Bolivia [García y col., 2009]), se encuentran elevadas similitudes en antígenos como MAP y FRA (Hernández y col., 2010). Probablemente, la reactividad cruzada podría evitarse seleccionando antígenos recombinantes adecuados (por ejemplo B13, CRA, TCD o TcE), que hayan demostrado experimentalmente la ausencia de reacciones cruzadas con sueros de individuos infectados con *Leishmania* o *T. rangeli* (Umezawa y col., 2004; Villa y col., 2007).

También es importante matizar que en zonas endémicas donde predomina *T. cruzi* I, suele circular *T. rangeli* que, aunque no es patógeno,

es responsable de muchas reacciones cruzadas, como hemos comentado anteriormente.

Otro aspecto a considerar es que como el resto de la población española, la población extranjera residente en España está expuesta a las infecciones autóctonas. Una de estas es la leishmaniosis causada por *L. infantum*, tripanosomátido que genera una respuesta humoral con una importante activación policlonal, origen de la reactividad cruzada en numerosas técnicas de detección de anticuerpos de enfermedades relacionadas e incluso no relacionadas con esta parasitosis (Salinas y col., 2007). En este caso, es importante tener en cuenta que la fiebre es un marcador clínico que caracteriza la infección por *L. infantum*, signo que en los enfermos de Chagas en fase crónica no suele aparecer. Por tanto, el diagnóstico serológico y diferencial deberá establecerse mediante el empleo de técnicas que tengan una mayor especificidad, como por ejemplo las que emplean el antígeno recombinante rK39, ya que como hemos visto, la prueba de IFI-*Leishmania* presenta reactividad cruzada con los sueros de los individuos con enfermedad de Chagas (Figura 17). En situaciones de inmunodepresión, la detección del parásito será siempre la mejor elección.

A este hecho se suma el aumento de los viajes a zonas tropicales y, por lo tanto, el riesgo de infección por otros agentes que pueden provocar activación policlonal. Este fenómeno podría interferir con el inmunodiagnóstico de *T. cruzi*, en especial en aquellas técnicas en las que intervienen anticuerpos IgM (ELISA Biokit).

En general, nuestros resultados confirman los datos obtenidos por otros autores. Todos los ELISA analizados (convencionales y no convencionales), obtienen buenos resultados de sensibilidad (100%) y especificidad (95,4%-98,5%) para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*. No obstante, ninguna prueba convencional o no convencional por sí sola puede establecer el diagnóstico o confirmación de la sospecha clínica, ni descarta el problema de la reactividad cruzada con otras infecciones. Por tanto, sigue siendo necesaria la combinación de dos técnicas, siendo una buena opción para el diagnóstico de rutina el empleo de un ELISA convencional con un ELISA no convencional. La combinación de pruebas

siempre generará resultados discrepantes, por lo general, en un número reducido de casos. Por esto la estrategia más adecuada para definir el significado de estas discrepancias sería el seguimiento serológico, apoyado de un buen diagnóstico diferencial en centros especializados.

En el trabajo también incluimos una prueba comercial de IFI con alta sensibilidad (100%) y buena especificidad (95,5%). Sin embargo, una de las limitaciones de las pruebas de IFI a la hora de aplicarse como ensayos de rutina, es que dependen de la experiencia técnica del operador en la lectura de la señal. Además, con frecuencia suelen producirse reacciones cruzadas con otras enfermedades, especialmente con *Leishmania*, cuando los títulos de anticuerpos oscilan entre 1/40-1/80. Sin embargo, puede ser un excelente test para el diagnóstico de infección por *T. cruzi* cuando los títulos son iguales o superiores a 1/320 (Coura y Borges-Pereira, 2012). En nuestro estudio, el punto de corte establecido es la dilución 1/80; con este título, observamos reacciones cruzadas con muestras con anticuerpos frente a *Leishmania* a 1/80 y 1/160, y frente a *Plasmodium* a títulos de 1/160, pero con títulos iguales o superiores a 1/320 no observamos ninguna.

Dada la falta de una técnica de referencia ampliamente aceptada y accesible para el diagnóstico serológico, resulta difícil validar nuevos ensayos serológicos, ya que no existe un método fácil para resolver el verdadero estatus de muestras no concluyentes o débilmente positivas.

Por tanto, a la hora de escoger una técnica diagnóstica hemos de tener en cuenta las ventajas e inconvenientes de cada una de ellas. Así, la IFI es una técnica muy sensible, con la que podemos obtener resultados cualitativos y cuantitativos (título). Por el contrario, es necesario disponer de un microscopio de fluorescencia, la interpretación de los resultados es subjetiva, y se requiere de personal experto. Por lo que respecta a las técnicas ELISA, son muy sensibles y específicas, con capacidad para procesar un elevado número de muestras, y la lectura de los resultados es objetiva. Como desventajas, es necesario una cadena de frío tanto para las muestras (-20°C) como para los reactivos (2-8°C), requiere personal entrenado, y el equipamiento y el material es caro.

Una realidad que hay que tener en cuenta, es el hecho de que el diagnóstico de la enfermedad de Chagas con ensayos tipo ELISA, habitualmente es realizado en laboratorios de referencia. Sin embargo, la mayoría de los pacientes con enfermedad de Chagas en países endémicos, viven en zonas rurales y periurbanas, donde los laboratorios no están equipados o no disponen de personal cualificado para realizar estas técnicas. Estas restricciones suponen un retraso en el diagnóstico, pérdida de los pacientes en seguimiento y un aumento en los costes sanitarios. Además, cuando estos ensayos convencionales son empleados en estas áreas, pueden perder parte de la sensibilidad y especificidad alcanzada en los laboratorios de referencia.

Recientemente, se han desarrollado test de diagnóstico rápido, cuyo fundamento es el empleo de proteínas recombinantes en un ensayo inmunocromatográfico. Las principales ventajas de estos test diagnósticos son: dispositivos de uso individual, permiten procesar un número elevado de muestras rápidamente, almacenamiento a temperatura ambiente, no requieren reactivos o equipamiento especial, y no necesitan personal especializado.

Desde un punto de vista epidemiológico, el empleo de estos test permite la implantación de estrategias de intervención *“in situ”*, como estudios de vigilancia serológica, ensayos clínicos o de vacunas, y la administración rápida de tratamiento en los brotes de Chagas agudo. Aunque comparativamente estos test resultan más caros, si tenemos en cuenta sus ventajas y considerando una buena sensibilidad y especificidad del mismo, podría considerarse coste-efectivo en determinadas circunstancias.

Actualmente, existen múltiples ensayos en este formato, y de todos ellos, Chagas Stat-Pack (Chembio Diagnostic Systems, Medford, NY), es el más empleado, y hasta el momento el único validado para utilizarse como herramienta de cribado serológico en bancos de sangre (Ponce y col., 2005), con una sensibilidad del 98,5-100% y especificidad estimada del 94,8-99,9%, en un estudio multicéntrico realizado en Sur y Centroamérica. Otras evaluaciones de la técnica en el terreno (Bolivia) mostraron una

sensibilidad y especificidad estimada de 93,4-94,7% y 97,3-99%, respectivamente (Chippaux y col., 2009).

Nuestra técnica muestra una buena sensibilidad (94,4%) y especificidad (92%). La concordancia entre los resultados de los test serológicos habituales y la técnica rápida fueron buenas (índice kappa: 0,89-0,92). Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios con la misma técnica, o con test rápidos de otras casas comerciales (Chagas Stat-Pack, Chembio Diagnostics; SD Bioline Chagas Ab rapid test (Standard Diagnostics) (Chippaux y col., 2009; Ji y col., 2009; Ponce y col., 2005; Sosa-Estani y col., 2005).

En términos de especificidad, es importante remarcar que nuestra técnica rápida no tiene reacciones cruzadas con los sueros de los pacientes con anticuerpos frente a *Leishmania*, *Plasmodium*, *Schistosoma* y virus del dengue. Estos pacientes suelen mostrar un elevado grado de activación policlonal, que produce fuertes reacciones cruzadas en los test de diagnóstico serológico convencional. En cuanto a la sensibilidad, en los test rápidos también existen variaciones tal y como previamente ha sido descrito para Chagas Stat-Pak (Chippaux y col., 2009), asociadas a la variabilidad genética de los aislados de *T. cruzi* en diferentes áreas geográficas. Como ocurre con los test diagnósticos convencionales, cuya idoneidad viene condicionada por la preparación del antígeno de diferentes cepas circulantes en distintas regiones endémicas, se piensa que los test basados en proteínas recombinantes también tendrán diferente sensibilidad según el área geográfica del estudio (Verani y col., 2009).

No obstante, a pesar de las ventajas descritas anteriormente, también existen otros factores (limitantes) que pueden influir en la realización de la técnica. El empleo de sangre como muestra en lugar de suero o plasma, puede hacer que la sensibilidad de la técnica disminuya en gran medida (Roddy y col., 2008; Flores-Chaves y col., 2012). Otro punto importante a tener en cuenta es el carácter subjetivo de la lectura de los resultados, especialmente grave cuando se trata de sueros débilmente positivos.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos, la prueba inmunocromatográfica incluida en este estudio, no alcanzaría índices diagnósticos que avalasen su incorporación en bancos de sangre como técnica de cribado. Sin embargo, la facilidad de su uso en la rutina diaria es indiscutible, puesto que estas técnicas no requieren infraestructura sofisticada, ni personal especializado. No obstante, todos los resultados (tanto positivos como negativos) deberían confirmarse con una segunda prueba (Luquetti y col., 2003).

Reconocimiento del péptido sintético 3973 en sueros de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica

A pesar de la cantidad de ensayos disponibles en el mercado con un elevado grado de precisión, el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas continúa siendo un problema. Como hemos comentado anteriormente, las diferencias en el estadio del ciclo vital del parásito y en el proceso de extracción y purificación de los componentes antigénicos, así como el protocolo del ensayo, constituye una permanente fuente de variación del producto final. Con el fin de mejorar esto en 1982, la OMS, recomendó el empleo de dos técnicas basadas en diferentes principios antigénicos. Esta estrategia mejoró la precisión de los resultados y minimizó el problema de sensibilidad y especificidad asociado a los test disponibles (Schmunis, 1991). Normalmente, al usar un único test la sensibilidad y especificidad estaban alrededor de 98,9% y 98,5%, respectivamente. Al usar dos o tres ensayos, la sensibilidad aumentaba hasta el 100%. Sin embargo, la especificidad permanecía o disminuía, además de aparecer un porcentaje significativo de resultados discordantes (Schmunis, 1991). Visto esto, varios grupos de investigación, intentaron identificar regiones inmunodominantes y fracciones antigénicas de *T. cruzi*, que fueran altamente sensibles y específicas en los ensayos. Con el desarrollo de las técnicas de biología molecular, se han aislado y secuenciado diferentes proteínas, se han clonado sus genes correspondientes, y posteriormente se han usado para producir proteínas recombinantes.

Para que estos antígenos puedan ser útiles en el diagnóstico de infección por *T. cruzi*, deberán cumplir varios criterios: estar presentes en los aislados del parásito de diferentes áreas endémicas, y ausente en otros agentes infecciosos; ser altamente inmunógenos en poblaciones con diferentes antecedentes genéticos, independientemente de la fase de la enfermedad, y deberán ser estables y fácilmente susceptibles de realizar controles de calidad que garanticen su reproducibilidad (Zingales y col., 1990).

El péptido sintético 3973 que nosotros evaluamos en este trabajo, se encuentra localizado en la proteína TcCA-2, proteína de superficie de membrana que contiene repetidos diferentes epítomos de 12-mer de longitud. Esta proteína también contiene el epítome TcMe que está implicado en la internalización del parásito en la célula hospedadora (Martin y col., 1997). Además se ha descrito que las secuencias repetidas en tándem homólogas en el antígeno B13 de *T. cruzi* pueden ser presentadas en asociación con al menos 3 moléculas distintas HLA de clase II a linfocitos T CD4 (Abel y col., 2005).

Nuestros resultados muestran como el péptido 3973 es detectado con alta sensibilidad (98,5%) por los sueros de los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica, independientemente del estadio en que se encuentren.

En cuanto a la especificidad, esta es superior al 97% cuando empleamos los sueros a una dilución del 1/1600. Sólo observamos reacciones cruzadas con una muestra suero de un paciente con anticuerpos frente a *Leishmania*, pero no frente a *Plasmodium* u otras enfermedades infecciosas.

Por tanto, el péptido sintético 3973 (empleando las muestras a la dilución 1/1600 y realizando la lectura de la absorbancia a los 5-7 minutos), nos permite disponer de un nuevo test diagnóstico de la enfermedad de Chagas con una buena sensibilidad (98,5%) y especificidad (97%).

Por lo que se refiere al efecto que pudiera tener la administración de tratamiento con benznidazol en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas empleando el péptido 3973, no observamos cambios en la respuesta antígeno-específica. Esto difiere de lo sugerido recientemente por algunos autores, según los cuales, el tratamiento con benznidazol, además de reducir la carga parasitaria, también disminuiría la cantidad de antígeno necesario para activar la respuesta de anticuerpos (Lauella y col., 2009). Así, en un estudio en el que se realizó un seguimiento a corto plazo de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica tratados con benznidazol, observaron como el patrón de respuesta humoral frente a determinados antígenos específicos se alteraba disminuyendo (Fernández-Villegas y col., 2011).

En cuanto al efecto que las posibles co-infecciones con otros patógenos (*H. pylori* y helmintos) pudieran tener en la respuesta antígeno-específica frente al péptido 3973, no observamos nada significativo.

Evaluación de un inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas (CMIA) para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Nuestro Servicio es centro de referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas con un alto número de determinaciones anuales (1.478 muestras en el año 2009; 1.013 muestras en el año 2010; 1.001 muestras en el año 2011). Esto supone un elevado volumen de trabajo, por lo que buscar nuevas técnicas que además de poseer buena sensibilidad y especificidad, sean rápidas y fáciles de realizar, es una prioridad.

La detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* continua siendo el principal procedimiento para el diagnóstico y cribado en bancos de sangre. El inconveniente fundamental de estos test es el amplio rango de sensibilidad y especificidad que presentan dependiendo del método y antígeno usado. El ensayo CMIA emplea 4 antígenos recombinantes (TcF, FP3, FP6 y FP10) (Chang y col., 2006; Cheng y col., 2007) que contienen 14 regiones antigénicas diferentes; estas regiones representan las 3 morfologías del parásito en su ciclo biológico que son las formas

encontradas tanto en el insecto vector como en el hospedador, lo que permite su empleo en el diagnóstico de enfermedad de Chagas tanto en fase aguda como crónica (da Silveira y col., 2001). La diversidad antigénica de estas proteínas constituye la base de su elevada sensibilidad (100%).

A pesar de tener menor especificidad (96,6%) que el resto de pruebas, el ensayo CMIA muestra una clara discriminación entre muestras positivas y negativas, lo que la convierte en una técnica adecuada para el diagnóstico. En el caso de las muestras positivas con resultados cercanos al punto de corte, sería recomendable realizar una segunda prueba, repetir el ensayo con una nueva muestra, o descartar posibles reacciones cruzadas. Así mismo, estudios previos han demostrado la buena precisión de este test con un coeficiente de variación inferior al 5%, reflejando su buena reproducibilidad (Praast y col., 2011).

Al mismo tiempo, la total automatización del proceso permite eliminar algunos de los inconvenientes de las técnicas empleadas habitualmente, como la interpretación subjetiva de los resultados que debe realizarse por personal con experiencia en el caso de la IFI, o procedimientos laboriosos y que requieren varias horas como en las técnicas ELISA.

Prevalencia de infección por *Helicobacter pylori* en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica

En países en vías de desarrollo, los individuos son más susceptibles de adquirir infecciones crónicas concurrentes con otros patógenos; sin embargo, la prevalencia de las coinfecciones es desconocida, así como el efecto que cada patógeno ejerce sobre la historia natural del otro.

H. pylori es un microorganismo ampliamente distribuido por todo el mundo, con elevada prevalencia en los países en vías de desarrollo, siendo la infancia el periodo más importante a la hora de adquirir la infección, afectando principalmente a niños con bajo nivel socioeconómico.

Tras el descubrimiento de *H. pylori* en 1982, Barbosa y colaboradores (1993) fueron los primeros en investigar la presencia de la bacteria en la mucosa gástrica de los pacientes con enfermedad de Chagas; tras ellos,

Oliveira y colaboradores (1998) evaluaron a los pacientes con enfermedad de Chagas en fase digestiva e indeterminada. En aquellos estudios la prevalencia de infección por *H. pylori* fue muy alta (aproximadamente 95%). No obstante, hay que tener en cuenta que ambos realizaron estudios no controlados con un número pequeño de pacientes.

Posteriormente, Nascimento y colaboradores (2002) encontraron una prevalencia de *H. pylori* significativamente superior en pacientes con enfermedad de Chagas con edades comprendidas entre 21-50 años, comparado con pacientes sin enfermedad de Chagas viviendo en la misma área rural o urbana. En otro estudio, Pinazo y colaboradores (2010_b) evaluaron una serie corta de inmigrantes latinoamericanos de alto riesgo residentes en Barcelona, confirmando la frecuente coexistencia de las infecciones de *H. pylori* y *T. cruzi*. Recientemente, Fonseca y colaboradores (2012) hallaron una prevalencia de *H. pylori* significativamente superior en pacientes con enfermedad de Chagas comparado con pacientes sanos.

Se han especulado diferentes causas que justificarían las diferencias entre ambos grupos de pacientes. *H. pylori* cuando alcanza la entrada del estómago de los pacientes con enfermedad de Chagas, encontraría una serie de condiciones favorables para su establecimiento tales como la hipoclorhídria, hipomotilidad, malnutrición y la existencia de deficiencias inmunológicas.

En los pacientes con enfermedad de Chagas, la hipoclorhídria (Morris y Nicholson, 1987) se ha descrito como un posible factor que facilita la infección por *H. pylori* ya que, incluso con sus múltiples mecanismos para adaptarse al ácido, es susceptible a éste, y sólo puede sobrevivir durante unos minutos al pH ácido del estómago. La disminución de la sensibilidad de las células parietales, consecuencia de la destrucción de la innervación intramural que se produce en estos pacientes, es la responsable de la aparición de la hipoclorhídria (Padovan y col., 1977). La destrucción neuronal del plexo gástrico intramural en pacientes con enfermedad crónica puede producir estasis gástrica (Padovan y col., 1977), predisponiendo el sobrecrecimiento bacteriano en el estómago y probablemente a la infección por *H. pylori*.

La malnutrición, a menudo encontrada en pacientes con la forma digestiva de la enfermedad de Chagas, es la causa más frecuente de inmunodeficiencia secundaria, comprometiendo la respuesta inmune específica y no específica (Voltarelli y Falcao, 1995). En pacientes con Chagas crónico, se han descrito múltiples cambios inmunológicos como leucopenia, disminución de la actividad quimiotáctica de los neutrófilos y linfopenia, que podrían incrementar la susceptibilidad de infección por *H. pylori* en estos individuos. Además, al menos en los niños, la malnutrición también puede producir hipoclorhidria, y por tanto favorecer la infección por *H. pylori*.

Considerando que la transmisión de *T. cruzi* y *H. pylori* está asociada a condiciones socioeconómicas pobres, la elevada prevalencia encontrada de co-infección con estos patógenos (78,8%) no es sorprendente, y es similar a la encontrada en otros países (Fonseca y col., 2012). En países como Bolivia, la prevalencia total es elevada al compararla con países desarrollados, aunque los valores probablemente varíen según el área geográfica estudiada. En el caso de Bolivia, no existen estudios de prevalencia de infección por *H. pylori* en adultos. Los únicos estudios realizados son en niños entre 5 y 8 años donde la seroprevalencia era del 74% (Santos y col., 2009.), mientras que otro realizado en una zona rural en niños de 6 años la seroprevalencia fue del 60% (Glynn y col., 2002).

No resulta extraordinario el hecho de no encontrar una mayor prevalencia de infección por *H. pylori* en pacientes con la forma digestiva (75%) de la enfermedad de Chagas en comparación con las formas indeterminadas (83,3%) y cardíacas (70%), ya que un paciente con enfermedad de Chagas con una u otra forma clínica, puede presentar lesiones en otras localizaciones según los criterios habitualmente empleados en la clasificación de las mismas. Según esto, en algunos estudios han observado importantes descensos de la población pancreática neuronal en pacientes con la forma cardíaca de la enfermedad (Rocha y col., 1998), o una hiposecreción de insulina tras estímulo con glucosa en pacientes con forma indeterminada, cardíaca o digestiva de la enfermedad de Chagas (Oliveira y col., 1993). También, se ha descrito una disminución

de la respuesta inmune celular, incluso en los pacientes con formas indeterminadas. Además, un número variable de pacientes con enfermedad de Chagas crónica en fase indeterminada, tienen alteraciones estructurales o funcionales del corazón o tracto digestivo que se descubren cuando se realizan test diagnósticos más sensibles.

Por otro lado, dado que la infección por *H. pylori* produce diversos efectos sobre la secreción ácida del estómago, podría considerarse la posibilidad de que algunas alteraciones fisiológicas del estómago, como la hipergastrinemia o hipoclorhidria, que originalmente fueron atribuidas a la enfermedad de Chagas (Rocha y col., 2009), puedan estar exacerbadas por la infección concurrente de *H. pylori*.

En nuestro estudio, no observamos una prevalencia de infección por *H. pylori* significativamente mayor en el grupo de pacientes con enfermedad de Chagas comparado con el grupo de pacientes sanos, ni entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad. Posiblemente debido, a que el número de pacientes evaluados con enfermedad de Chagas en fase crónica no es elevado.

Diferentes estudios epidemiológicos han mostrado que la prevalencia de *H. pylori* se incrementa con la edad, datos que coinciden con los encontrados en este estudio, ya que la prevalencia de infección por *H. pylori* se incrementa entre los pacientes con enfermedad de Chagas menores de 50 años. Nuestros datos indican que los pacientes con enfermedad de Chagas, tiene un riesgo alto de adquirir la infección por *H. pylori* tanto en la infancia como en la vida adulta. Además, como se muestra en otros estudios, observamos una disminución de la prevalencia de la infección entre los pacientes de más edad, lo que podría explicarse por el fallo de la respuesta serológica específica debido a la disminución general de la inmunidad (Rodríguez y col., 2005).

El origen rural de los pacientes con enfermedad de Chagas, donde factores como el bajo nivel socioeconómico, condiciones de vida precarias, y la ingestión de agua no tratada, especialmente durante la infancia, son considerados como importantes factores para la infección por *H. pylori*

(Klein y col., 1991), no parecen ser responsables de la elevada prevalencia de esta infección en los pacientes con enfermedad de Chagas, comparado con el grupo de pacientes sanos procedentes de zonas rurales, en los mismos rangos de edades.

Seroprevalencia de helmintiasis en pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica

La Organización mundial de la Salud estima que más de 2 billones de personas en el mundo viven con enfermedades producidas por parásitos intestinales, especialmente en países en vías de desarrollo (OMS, 2005). La OPS/OMS calcula que el 20-30% de la población de los países latinoamericanos están infectados por helmintos intestinales (parásitos intestinales), mientras que las cifras en las zonas más pobres alcanzan con frecuencia el 50%, y hasta el 95% en algunas poblaciones indígenas (PAHO, 2007). Estas enfermedades son conocidas como desatendidas, por la poca importancia que dan los gobiernos y por ser consideradas como baja prioridad de salud pública internacional. La mayor frecuencia de estas enfermedades enteroparasitarias se observa en los sectores rurales, fundamentalmente por las condiciones de vida para el individuo.

En Bolivia, existen aproximadamente 17 especies de parásitos como productores potenciales de infección intestinal humana, entre los que encontramos 5 protozoos y 12 helmintos. Aproximadamente, el 65% de la población boliviana está multiparasitada, y por lo menos una cuarta parte de estas personas tiene cargas parasitarias de niveles moderado a intenso (Mollinedo y Prieto, 2006). En Bolivia no existe información actual de la prevalencia de las parasitosis intestinales.

Estos niveles tan altos de parasitación hacen que la co-infección con otros parásitos endémicos como es el caso de *T. cruzi* sea muy frecuente. En nuestro estudio encontramos unas elevadas prevalencias de co-parasitación con *Ascaris lumbricoides* (77,3%) y algo menores con *Strongyloides stercoralis* (21,2%) y *Schistosoma mansoni* (4,5%).

Las infecciones por helmintos son con frecuencia masivas, crónicas y fuertemente inductoras de citocinas Th2. Esto implica que infecciones por

estos parásitos, puedan alterar la susceptibilidad a posteriores infecciones por otros patógenos, especialmente intracelulares. La natural coexistencia de dos o más patógenos infectando un individuo, implica que la presencia de uno de ellos podría alterar la susceptibilidad a posteriores infecciones. La respuesta protectora frente algunos patógenos, principalmente virus y parásitos intracelulares, está mediada por una respuesta tipo Th1 (Clerici y Shearer, 1994; Reiner y Locksley, 1995). En contraste la respuesta Th2 dependiente, puede proteger contra algunos parásitos extracelulares (Pearce y Reiner, 1995). La mayoría de los helmintos inducen una respuesta Th2 (Pearce y Reiner, 1995), lo que podría explicar el incremento en la susceptibilidad a otro patógeno frente a los que es necesaria una respuesta Th1, o al contrario explicaría cualquier disminución en la susceptibilidad frente a aquellos microorganismos contra los que se necesita una respuesta Th2.

Debido al establecimiento de las infecciones crónicas y, probablemente por la fuerte inducción de la respuesta tipo Th2 (Kullberg y col., 1992; Kullberg y col., 1996), los helmintos podrían tener una influencia significativa sobre la naturaleza de la respuesta inmune de los individuos infectados, y por lo tanto, modificar su susceptibilidad a infecciones posteriores con otros patógenos importantes, al menos en aquellas frente las cuales se requiere una respuesta de tipo Th1 (*M. tuberculosis*, *L. major*, *Plasmodium* sp.) (Martin y col., 1995; Reiner y Locksley, 1995; Stevenson y Tam, 1993). Esto es relevante cuando se considera la persistencia a largo plazo de los parásitos, tales como helmintos, que están ampliamente distribuidos en muchos países en vías de desarrollo, donde coexisten con otros agentes patógenos que tienen un mayor impacto en las tasas de mortalidad. El riesgo potencial de que toda la población pudiera tener una mayor susceptibilidad a otros patógenos, como microorganismos intracelulares, debe hacer pensar en la posible importancia epidemiológica de las infecciones por helmintos, y los efectos de su control sobre la incidencia o la patogénesis de otras enfermedades asociadas.

Se han realizado diferentes estudios sobre las posibles interacciones que se producirían entre diversos helmintos y protozoos. Así pues, en el

estudio realizado por Kloetzel y colaboradores (1973), detectaron un incremento de la parasitemia de *T. cruzi* en ratones con esquistosomosis, cuando la infección por *S. mansoni* precedía a la inoculación de *T. cruzi*. Estos hallazgos sugerían que el proceso de inmunodepresión que se establece durante la infección por *Schistosoma*, podría producir cambios en la respuesta del hospedador frente al protozoo.

En otro estudio realizado por Chieffi en 1992, se analizó el efecto que tenían infecciones previas con protozoos como *Toxoplasma gondii*, *T. cruzi*, *T. brucei* y *Plasmodium* en ratones con esquistosomosis; observó la tendencia a reducir el área de reacción granulomatosa alrededor de los huevos de *S. mansoni* retenidos en los tejidos, sugiriendo una disminución de la actividad de los mecanismos protectores debido a la inmunodepresión celular. En estos casos, sin embargo, se observaron manifestaciones clínicas menos marcadas que en los controles infestados sólo con *S. mansoni*.

Posteriormente, Marshall y colaboradores (1999) estudiaron la influencia de la respuesta Th2 inducida por el helminto, en una infección con una respuesta Th1 inducida por el protozoo *T. gondii*. La respuesta Th2 polarizada por la co-infección con *S. mansoni*, disminuye la patología intestinal asociada a la infección por *T. gondii*, por una disminución de la regulación de IFN- γ y óxido nítrico típicamente asociado a la respuesta Th1.

De todos los protozoos, *Plasmodium* es el parásito más estudiado en las co-infecciones con helmintos. Dependiendo del estudio, no está claro si la interacción entre ambos es beneficiosa (Nacher y col., 2000), indiferente (Shapiro y col., 2005) o perjudicial (Drulihe y Sokhna, 2005). A pesar de ello, los helmintos parecen estar asociados con protección frente a complicaciones severas de la malaria, especialmente *A. lumbricoides*, y con aumento de la incidencia o prevalencia de la misma (Nacher, 2011).

En el caso de *T. cruzi* los estudios de co-parasitación con helmintos son escasos. Rodríguez y colaboradores (1999) realizaron un estudio en el que se observó que la presencia del cisticerco de *Taenia crassiceps* en ratones,

modificaba la susceptibilidad y la respuesta inmune frente a *T. cruzi*, dependiendo del tiempo de evolución de la infección inicial.

Sin embargo, a pesar de que la inmunidad de *T. cruzi* se ha estudiado ampliamente, en estos momentos sigue sin comprenderse totalmente. Por tanto, la modulación crónica de los helmintos hacia una respuesta Th2, podría modificar algunos de los aspectos de la inmunidad frente a la enfermedad de Chagas, tal y como ocurre en la malaria (Nacher, 2011).

No obstante, se necesitan más investigaciones para desentrañar los mecanismos inmunológicos subyacentes y las diferencias que existen entre los distintos helmintos.

Por lo que respecta a *Trichinella spirallis*, produce enfermedad en un porcentaje pequeño de los casos en humanos, y se relaciona con la ingestión de una gran cantidad de larvas y con la patogenicidad de la cepa. La invasión de la pared intestinal, fundamentalmente del duodeno y el yeyuno, por los parásitos hembras origina una inflamación transitoria que puede producir diarrea y dolor abdominal semejantes a los asociados con muchas otras infecciones intestinales. La letalidad por triquinosis es menor del 1% y obedece a complicaciones secundarias graves ocasionadas por la localización encefálica, cardíaca o diafragmática de las larvas (Capo y Despommier, 1996).

Aunque se han realizado pocas investigaciones para confirmar su presencia en los países de América Latina, Asia y África, es probable que *Trichinella* esté diseminada en todo el mundo. En países como Chile y Argentina, donde ocurren periódicamente brotes epidémicos de triquinosis (Venturiello y col., 1993), la enfermedad tiene una prevalencia del 2-5% y constituye un importante problema de salud pública (López y col., 1992). Por lo que se refiere a Bolivia, hasta 1993 se consideraba que la infección no existía en el país. En esta fecha, Bjorland y colaboradores (1993) demostraron por primera vez una seroprevalencia de anticuerpos contra *T. spiralis* del 11,2% en cerdos de 10 comunidades rurales del Altiplano. Posteriormente, otros investigadores repitieron el estudio en cerdos pertenecientes a mataderos de tres centros urbanos de los departamentos

de Monteagudo, Vallegrande y Santa Cruz, encontrando seroprevalencias del 12,4%, 17,1% y 10,2%, respectivamente (Brown y col., 1996).

En nuestro caso no se detectaron anticuerpos contra *T. spiralis* en ninguna de las 86 muestras de suero examinadas, en contraste con el 3% de seroprevalencia encontrada en el estudio de Bartolini (Bartolini y col., 1999). A pesar de la diferencia, no resulta nada extraño nuestro resultado; en el estudio de Bartolini se empleó un tamaño de muestra casi tres veces superior (234 pacientes frente a los 87 pacientes nuestros) y todos ellos procedían de una zona rural del Departamento de Santa Cruz, cuya principal fuente de economía es la agricultura y crianza de animales, sobretodo ganado porcino y bovino, que habitualmente viven en libertad alrededor de la vivienda y se sacrifican de forma clandestina o domiciliaria. Nuestros pacientes, aunque aproximadamente el 84% procedía de zona rural, poco más del 30% era del Departamento de Santa Cruz, lo que puede influir en los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Los datos obtenidos por Bartolini documentan por primera vez la existencia de la infección en la población humana de Bolivia. Estos resultados coinciden con las tasas de prevalencia observadas en otros países de América del Sur (Venturiello y col., 1993; López y col., 1992).

Aunque se desconoce si se dispone de información actual sobre casos de triquinosis humana en Bolivia, debe tenerse en cuenta que la mayoría de las infecciones humanas son subclínicas y que la intensidad del cuadro clínico está relacionada directamente con la cantidad de larvas ingeridas. La prevalencia relativamente baja de anticuerpos contra *T. spiralis* encontrada en la población humana estudiada, puede explicarse por la costumbre de comer la carne bien cocida, ya que la cocción a una temperatura superior a 77°C destruye las larvas y es la medida más eficaz para prevenir la triquinosis humana (McAukey y col., 1991).

VI. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo conducen a las siguientes conclusiones:

1. En la fase crónica de la enfermedad de Chagas, las técnicas parasitológicas clásicas empleadas para el diagnóstico (técnica de Strout y hemocultivo) no son de utilidad. Por lo que respecta a la técnica de PCR, debido a su limitada sensibilidad (65%) y falta de estandarización, no es una herramienta diagnóstica adecuada para la detección de *Trypanosoma cruzi*.
2. Todas las técnicas de diagnóstico serológico (convencionales y no convencionales) tienen buenos valores de sensibilidad (100%) y especificidad (95,4%-98,5%) para el diagnóstico de infección por *Trypanosoma cruzi*. No obstante, ninguna prueba convencional o no convencional, por sí sola puede establecer el diagnóstico o confirmación de la sospecha clínica, siendo necesaria la combinación de dos técnicas con diferentes antígenos.
3. Al no existir una técnica de referencia o “patrón de oro” para realizar un diagnóstico adecuado, lo más recomendable es combinar el uso de las técnicas parasitológicas, serológicas y moleculares de acuerdo con la fase de la enfermedad que se sospecha.
4. A pesar de las numerosas ventajas de las nuevas técnicas inmunocromatográficas, para poder emplearse como técnicas efectivas de cribado debería mejorarse su sensibilidad (94,4%).
5. El ensayo “ARCHITECT Chagas®”, en nuestro estudio presentó una sensibilidad del 100% y especificidad del 96,6%. Además, la total automatización del test permite procesar un mayor número de muestras, de manera más rápida, con una mayor estandarización y reproducibilidad de los resultados, así como una interpretación totalmente objetiva de los mismos.

6. El péptido sintético 3973 muestra una buena sensibilidad y especificidad para su empleo en el diagnóstico de enfermedad de Chagas en fase crónica.

7. Los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica no tienen una prevalencia de infección por *H. pylori* superior a los pacientes sanos. Además, no encontramos asociación entre *H. pylori* y la forma clínica de la enfermedad o la procedencia (zona rural o urbana) del individuo.

8. Los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica tienen una alta prevalencia de co-infección con helmintos, pero esta fue similar a la encontrada en los pacientes sanos. Además, no encontramos asociación con la forma clínica de la enfermedad o la procedencia (zona rural o urbana) del individuo.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abel LC, Iwai LK, Viviani W, Bilate AM, Fae KC, Ferreira RC, Holdberg AC, Juliano L, Juliano MA, Ianni B, Mady C, Gruber A, Hammer J, Sinigaglia F, Kalil J, Cunha-Neto E.** 2005. T cell epitope characterization in tandemly repetitive *Trypanosoma cruzi* B13 protein. *Microbes Infect* 7:1184-1195.
- Acquatella H.** 2007. Echocardiography in Chagas heart disease. *Circulation* 115:1124-1131.
- Aguirre S, Silver AM, Brito MEF, Ribone ME, Lagier CM, Marcipar IS.** 2006. Design, construction, and evaluation of a specific chimeric antigen to diagnose chagasic infection. *J Clin Microbiol* 44:1043-1046.
- Almeida E, Krieger MA, Carvalho MR, Oelemann W, Goldenberg S.** 1990. Use of recombinant antigens for the diagnosis of Chagas disease and blood bank screening. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85:513-517.
- Alves MJ, Abuin G, Goncalves F, Kuwajima Y, Colli W.** 1987. Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* surface antigens detected by monoclonal antibodies, p. 323-332. En: Agabian N, Goodman H & Nogueira N (eds), *Molecular Strategies of Parasitic Invasion*, UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, New Series, vol. 42, Alan R Liss, New York.
- Amato NV, Matsubara L, Campos R, Moreira AA, Pinto PL, Faccioli R.** 1992. *Trypanosoma cruzi* in the milk of women with chronic Chagas disease. *Rev Hosp Clin* 47:10-11.
- Amato-Neto V, de Marchi CR, Ferreira CS, Ferreira AW.** 2005. Observations on the use of TESA blot for the serological diagnosis of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:534-535.
- Anandarao R, Swaminathan S, Fernando S, Jana AM, Khanna N.** 2005. A custom-designed recombinant multi-epitope protein as a dengue diagnostic reagent. *Protein Expr Purif* 41:136-147.
- Andrade SG.** 1982. The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76:123-128.

- Andrade SG, Magalhaes JB.** 1996. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlation with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop 30:27-35.
- Andrews NW, Colli W.** 1982. Adhesion interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J Protozool 29:264-269.
- Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Gonzalez N, Ramirez JL, Guevara P, Rivero C, Borges R, Scorza JV.** 1999. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. Am J Trop Med Hyg 60(2):215-222.
- Apt W.** 2010. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Des Dev Ther 4:243-253.
- Araujo FG, Guptill D.** 1984. Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 33:362-371.
- Araujo MSS, Martins-Filho AO, Pereira MES, Brener Z.** 2000. A combination of benznidazole and ketaconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. J Antimicrob Chemot 45:819-824.
- Avila HA, Sigaman DS, Cohen LM, Milikan RC, Sompson L.** 1991. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol 48:211-221.
- Aznar C, Liegeard P, Mariette C, Lafon S, Levin MJ, Hontebeyrie M.** 1997. A simple *Trypanosoma cruzi* enzyme-linked immunoassay for control of human infection in nonendemic areas. FEMS Immunol Med Microbiol 18:31-37.
- Azogue E, Darras C.** 1991. Prospective study of Chagas disease in newborn children with placental infection caused by *Trypanosoma cruzi* (Santa Cruz-Bolivia). Rev Soc Bras Med Trop 24:105-109.
- Barbosa AJ, Queiroz DM, Nogueira AM, Roquette Reis MJ, Mendes EN, Rocha GA, Romanello LM, Troncon LE.** 1993. Chronic gastritis and

Helicobacter pylori in digestive form of Chagas' disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 35(2):117-121.

Barcán L, Luna C, Clara L, Sinagra A, Valledor A, De Rissio AM, Gadano A, García MM, de Santibaños E, Riarte A. 2005. Transmission of *T. cruzi* infection via liver transplantation to a nonreactive recipient for Chagas' disease. Liver Transpl 11(9):1112-1116.

Bartolini A, Cancrini G, Bartalesi F, Nicoletti A, Mendez Prado G, Rosado J, Roselli M, Paradisi F. 1999. Anticuerpos contra *Trichinella spiralis* en la población rural de la provincia de Cordillera, Bolivia. Pan Am J Public Health 5:97-99.

Basombrio MA, Nasser J, Segura M, Marco D, Sanchez-Negrette O, Padilla M, Mora M. 1999. La transmisión de la enfermedad de Chagas en Salta y la detección de casos congénitos. Medicina (Buenos Aires) 59 (Suppl 2):143-146.

Beltrao B, Cerroni M, Freitas D, Pinto A, Valente S, Costa E, Sobel J. 2009. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. Trop Doc 39:231-232.

Bern C, Montgomery SP. 2009. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. Clin Infect Dis 49:e52-54.

Bern C, Verastegui M, Gilman RH, La Fuente C, Galdos-Cardena G, Calderon M, Pacori J, del Carmen M, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH. 2009. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. Clin Infect Dis 49:1667-1674.

Bern S, Yabsley MJ, Montgomery SP. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. Clin Microbiol Rev 24:655-681

Bittencourt AL. 1976. Congenital Chagas disease. Am J Dis Child 130:97-103.

- Bittencourt AL.** 1988. American trypanosomiasis (Chagas' disease), p. 62-86. En: McLeod C (ed.), Parasitic Infections in Pregnancy and the Newborn. Oxford University Press, Oxford.
- Bittencourt AL.** 1992. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 34:403-408.
- Bjorland J, Brown D, Gamble HR, McAuley JB.** 1993. *Trichinella spiralis* infection in pigs in the Bolivian Altiplano. Vet Parasitol 47:349-354.
- Boes M.** 2000. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. Mol Immunol 37:1141-1149.
- Boletín Oficial del Estado.** Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión, núm. 225, 31288-31304.
- Bolpe J, Boffi R.** 2001. Human trichinellosis in Argentina. Review of the casuistry registered from 1990 to 1999. Parasite 8 (2S), S78-S80.
- Bosseno MF, Yacsik N, Vargas F, Brenière SF.** 2000. Selection of *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes (clones 20 and 39) isolated from Bolivian triatomines following subculture in liquid medium. Mem Inst Oswaldo Cruz 95:601-607.
- Bosseno MF, Barnabé C, Magallón Gastélum E, Lozano Kasten F, Ramsey J, Espinoza B, Brenière SF.** 2002. Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. J Clin Microbiol 40(2):627-32.
- Brabin L.** 1992. The epidemiological significance of Chagas' disease in women. Mem Inst Oswaldo Cruz 87:73-79.
- Bratz LM, Amato N, Carignani FL, De Marchi CR.** 2001. *Trypanosoma cruzi* parasitemia observed in immunocompromised patients: the importance of the artificial xenodiagnosis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 43:113-115.
- Brener Z.** 1973. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol 27:347-382.

- Brener Z.** 1981. "Chagas' disease", p. 345-363. En: Michal (ed.), Modern genetics concepts techniques in the study of parasites. Shwabe Basel.
- Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Bastrenta B, Yacsik N, Noireau F, Alcazar JL, Barnabé C, Wincker P, Tibayrene M.** 1998. Different behavior of two *Trypanosoma cruzi* major clones: transmission and circulation in young Bolivian patients. *Exp Parasitol* 89:285-295.
- Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morecl CM.** 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:171-172.
- Brown DF, Mendez Prado GA, Quiroga JL, Dtagg DA, Mendez Cadima GJ, Sanchez Mendez LH, Méndez Cuellar R.** 1996. *Trichinella spiralis* infection in pigs in Eastern Bolivia. *Trop Anim Health Prod* 28:137-142.
- Brutus L, Schneider D, Postigo J, Delgado W, Mollinedo S, Chippaux JP.** 2007. Evidence of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in a vector-free area of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101(11):1159-1160.
- Brutus L, Schneider D, Postigo J, Romero M, Santalla J, Chippaux JP.** 2008. Congenital Chagas disease: diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop* 106(3):195-199.
- Brutus L, Santalla JL, Sakas NA, Schneider D, Chippaux JP.** 2009. Screening for congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in France. *Bull Soc Pathol Exot* 102(5):200-309.
- Burleigh BA, Andrews NW.** 1995. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol* 49:175-200.
- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, Saez- Alquezar A, Umezawa ES.** 2007. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determinate cross reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol* 14:1045-1049.

- Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, Souza JM, Carvalheiro JR, Yanovsky JF, Guimarães MC.** 1986. Three years of collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas: an appraisal. *Bull Pan Am Health Organ* 20(3):233-244.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR.** 2004. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med* 4:549-562.
- Cancado JR.** 2002. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 44:29-37.
- Capo V, Despommier DD.** 1996. Clinical aspects of infection with *Trichinella* spp. *Clin Microbiol Rev* 9:47-54.
- Carlier Y, Luquetti A, Pinto-Dias JC, Truyens C, Kirchhoff L.** Chagas disease (american trypanosomiasis). [consultado 15 Marzo 2012]. Disponible en: <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm>. 2003
- Carod-Artal FJ.** 2006. Chagas' disease and ischemic stroke. *Neurologia* 21(3):135-149.
- Carranza JC, Valadares HM, D'Avila DA, Baptista RP, Moreno M, Galvao LM, Chiari E, Sturm NR, Gontijo ED, Macedo AM, Zingales B.** 2009. *Trypanosoma cruzi* maxicircle heterogeneity in Chagas disease patients from Brazil. *Int J Parasitol* 39:963-973.
- Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvao LM.** 2002. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 88:894-900.
- Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC.** 2006. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum and Exp Toxicol* 25(8):471-479.
- Centers for Disease Control and Prevention.** 2002. Chagas disease after organ transplantation-United States, 2001. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 51:210-212.

- Chagas C.** 1909. Nova Tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1:1-80.
- Chang CD, Cheng KY, Jiang LX, Salbilla VA, Haller AS, Yem AW, Byant JD, Kirchoff LV, Leivy DA, Schochetman G, Shah DO.** 2006. Evaluation of a prototype *Trypanosoma cruzi* antibody assay with recombinant on a fully automated chemiluminescence analyzer for blood donor screening. Transfusion 46:1737-1744.
- Cheng KY, Chang CD, Salbilla VA, Kirchoff LV, Leiby DA, Schochetman G, Shah DO.** 2007. Immunoblot assay using recombinant antigens as a supplemental test to confirm the presence of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Clin Vaccine Immunol 14:355-361.
- Chieffi PP.** 1992. Interrelationship between schistosomiasis and concomitant disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 87:291-296.
- Chiller TM, Samudio M, Zoulek G.** 1990. IgG reactivity with *Trypanosoma cruzi* and Leishmania antigens in sera of patients with Chagas' disease y leishmaniasis. Am J Trop Med Hyg 43:650-656.
- Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, Morris MI, Nowicki M, Wright C, Ison MG.** 2011. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. Am J Transplant 11(4):672-680.
- Chippaux JP, Santalla JA, Postigo JR, Romero M, Salas-Clavijo NA, Schneider D, Brutus L.** 2009. Sensivity and specificity of Chagas Stat-Pak test in Bolivia. Trop Med Int Health 14(7):732-735.
- Chocair PR, Sabbaga E, Amato Neto V, Shiroma M, Goes GM.** 1981. Kidney transplantation: a new way of transmitting Chagas disease. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 23:280-282.
- Clerici M, Shearer GM.** 1993. A Th1-Th2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. Immunol Today 15:575-581.

- Corral RS, Altcheh JM, Freilij HL.** 1998. Presence of IgM antibodies to *Trypanosoma cruzi* urinary antigen in sera from patients with acute Chagas' disease. *Int J Parasitol* 28:589-594.
- Corrales RM, Mora MC, Negrette OS, Diosque P, Lacunza D, Virreira M, Brenière SF, Basombrio MA.** 2009. Congenital chagas disease involves *Trypanosoma cruzi* sub-lineage IId in the northwestern province of Salta, Argentina. *J Mol Epidemiol Evol Gen Infect Dis* 9:278-282.
- Coura JR, Junqueira AC, Fernandes O, Valente A, Miles MA.** 2002. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18:171-176.
- Coura JR, Borges-Pereira J.** 2012. Chagas disease. What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 45:286-296.
- Coura JR, Junqueira AC.** 2012. Risks of endemicity, morbidity and perspectives regarding the control of Chagas disease in the Amazon Region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:145-154.
- Crompton DWT.** 1999. "How much helminthiasis is there in the world?" *J Parasitol.* 85:397-403.
- Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarrollo ME, Pilleggi F, Kalil J.** 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Nat Aca Sci USA* 92:3541-3545.
- Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J.** 1996. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J Clin Invest* 98:1709-1712.
- da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO.** 2001. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol* 17:258-291.

- Deane LM.** 1964. Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. Rev Bras Malar Doencas Trop 16:27-48.
- de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O.** 2010. Large Urban Outbreak of Orally Acquired Acute Chagas Disease at a School in Caracas, Venezuela. J Infect Dis 201(9):1308-1315.
- de Rezende JM, Moreira H.** 1988. Chagasic megaesophagus and megacolon. Historical review and present concepts. Arq Gastroenterol 25:32-43.
- de Rezende JM, Rosa H, Vaz Mda G, Andrade-Sá N, Porto JD, Neves Neto J, Ximenes JA.** 1985. Endoscopy in megaesophagus. Prospective study of 600 cases. Arq Gastroenterol 2(2):53-62.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ.** 2002. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. Mem Inst Oswaldo Cruz 97:603-612.
- di Noia JM, Buscaglia CA, de Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC.** 2002. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to single parasite lineage. J Exp Med 195:401-413.
- DOC ID 3771208.** 2010. Investigator's Brochure: Information for the Investigational Product Posaconazole SCH 56592 Antifungal Agent. Kenilworth (NJ, USA): Schering-Plough Research Institute.
- dos Santos DM, Talvani A, Da Mata Guedes PM, Machado-Coelho LL, De Lana M, Bahía MT.** 2009. *Trypanosoma cruzi*: genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during the experimental infection. Exp Parasitol 121:8-14.
- Drulihe P, Sokhna C.** 2005. Worms can worsen malaria: towards a new means to roll back malaria?. Trends Parasitol 21:359-362.
- Enciso C, Montilla M, Santacruz MM, Nicholls RS, Rodríguez A, Mercado M, Puerta C.** 2004. Comparison of the indirect immunofluorescent

(IFAT), ELISA test and the comercial Chagatek test for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies detection. Biomedica 24(1):104-108.

Fernandes MC, Andrews NW. 2012. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. FEMS Microbiol Rev 17.

Fernández-Villegas A, Pinazo MJ, Marañón C, Thomas MC, Posada E, Carrilero B, Segovia M, Gascón J, López MC. 2011. Short-term follow-up chagasic patients after benznidazole treatment using multiple serological markers. BMC Infect Dis 11:206-213.

Ferreira AW, Avila SLM. 1996. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 38:264.

Filardi LS, Brener Z. 1987. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans R Soc Trop Med Hyg 5:755-759.

Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, Cruz I, Gárate T, Cañavate C. 2008. Transfusional chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. Clin Infect Dis 46(5):e44-47.

Flores-Chávez M, Cruz I, Nieto J, Gárate T, Navarro M, Pérez-Ayala A, López-Vélez R, Cañavate C. 2012. Sensivity and specificity of an Operon immunochromatographic test in serum and whole blood samples for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in Spain, an area of nonendemicity. Clin Vaccine Immunol 19:1353-1359.

Fonseca F, Queiroz DM, Camargos AM, Prata A, Crema E, Rodriguez V, Ramirez LE, Gonzalvez A. 2012. Seroprevalence of *Helicobacter pylori* infection in chagasic and non-chagasic patients from the same geographical region of Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 45(2):194-198.

Forés R, Sanjuán I, Portero F, Ruiz E, Regidor C, López-Vélez R, Linares M, Gil S, Ojeda E, Krasnik I, Bautista G, Vallejo C, García-Marco J, Fernández MN, Cabrera JR. 2007. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. Bone Marrow Transplant 39(2):127-128.

- Francolino SS, Antunes AF, Talice R, Rosa R, Selanikio J, de Rezende JM, Romanha AJ, Dias JC.** 2003. New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 36:103-107.
- Freilij H, Muller L, Gonzalez-Cappa SM.** 1983. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 18(2):327-330.
- Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinsteins S.** 1987. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 25:133-137.
- Freilij HJ, Altcheh R, Storino R.** 1994. Chagas congénito (capítulo 15). En: *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires. Doyma Argentina, Division Mosby, 267-268.
- Freilij H, Altcheh J.** 1995. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis*. 21:551-555.
- Freitas JLP, Amato-Neto V, Sonntag R, Biancalana A, Nussenzweig V, Barreto JG.** 1952. Primeiras verificações da transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Revista Paulista de Medicina* 40:36-40.
- Galvao C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg J.** 2003. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Leannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae), and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa* 202:1-36.
- García AL, Parrado R, Rojas R, Delgado R, Dujardin JC, Reithinger R.** 2009. Leishmaniasis in Bolivia: comprehensive review and current status. *Am J Trop Med Hyg* 80:704-711.
- Gascón J.** 2005. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas importada. *Medicina Clínica (Barcelona)* 125:230-235.
- Gascón J, Bern C, Pinazo MJ.** 2010. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica* 115:22-27.
- Girones N, Cuervo H, Fresno M.** 2005. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas disease. *Curr Top Microbiol and Immunol* 296:89-

123.

Glynn MK, Friedman CR, Gold BD, Khanna B, Hutwagner L, Iihoshi N, Revollo C, Quick R. 2002. Seroincidence of *Helicobacter pylori* infection in a cohort of rural Bolivian children: acquisition and analysis of possible risk factors. Clin Infect Dis 35:1059-1065.

Gobierno Autónomo de la Comunidad Valenciana. 2009. Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de actuación en la Comunitat Valenciana. Valencia: Conselleria de Sanitat, Generalitat Valenciana (Consultado el 14 de Abril de 2012). Disponible en: http://biblioteca.sp.san.gva.es/biblioteca/publicaciones/MATERIAL/PUBLICACIONES/INFAN_MUJER/PERINATAL/MANUAL_ENF_CHAGAS.pdf.

Gobierno Autónomo de Cataluña. 2010. Protocolo de cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés. Barcelona: Departamento de Salud, Generalitat de Catalunya (Consultado el 14 de Abril de 2012). Disponible en: http://www.gencat.cat/salut/depsalut/html/en/dir3559/chagasprot_eng.pdf.

Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E. 1998. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. Exp Parasitol 88(1):28-33.

Gomes YM, Pereira VR, Nakazawa M, Rosas DS, Barros MD, Ferreira AG, Silva ED, Ogatta SF, Krieger MA, Goldenberg S. 2001. Serodiagnosis of chronic Chagas infection by using EIE-Recombinant-Chagas-Biomanguinhos kit. Mem Inst Oswaldo Cruz 96(4):497-501.

Goto Y, Carter D, Reed D. 2008. Immunological dominance of *Trypanosoma cruzi* tandem repeat proteins. Infect Immun 76:3967-3974.

Guerreiro C, Machado A. 1913. Da reação de Bordet e Gengou na molétia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. Brasil Med 27:225-226.

Guerri-Gutemberg RA, Grana DR, Ambrosio G, Milei J. 2008. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! Eur Heart J 29 (21):2587-2591.

- Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D.** 1987. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 94:475-484.
- Hermann E, Truyens C, Alonso-Vega C, Rodriguez P, Berthe A, torrico F, Carlier Y.** 2004. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* is associated with maternal enhanced parasitemia and decreased production of interferon-g in response to parasite antigens. *J Infect Dis* 189:1274-1281.
- Hernández P, Heimann M, Riera C, Solano M, Santalla J, Luquetti AO, Beck E.** 2010. Highly effective serodiagnosis for Chagas disease. *Clin Vaccine Immunol* 17:1598-1604.
- Herwaldt BL.** 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 14:659-688.
- Higuchi ML, Brito T, Reis M, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F.** 1993. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammation in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Card Pathol* 2: 101-106.
- Hoft DF, Kim KS, Otsu K, Moser DR, Yost WJ, Blumin JH, Donelson JE, Kirchhoff LV.** 1989. *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. *Infect Immun* 57:1959-1967.
- Hoft DF.** 1996. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 55:360-364.
- Hoft DF, Farrar PI, Kratz-Owens K, Shaffer D.** 1996. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infect Immun* 64:3800-3810.
- Houghten RA.** 1985. General method for the rapid solid-phase synthesis of large numbers of peptides: specificity of antigen-antibody interaction at the level of individual amino acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:5131-5135.

- Houghton RL, Benson DR, Reynolds LD, McNeill P, Sleath P, Lodes M, Skeiky YA, Badaro R, Krettli AU, Reed SG.** 2000. Multiepitope synthetic peptide and recombinant protein for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* in patients with treated or untreated Chagas' disease. *J Infect Dis* 181:325-330.
- Ienne S, Pedroso A, Carmona EFR, Briones MR, Zingales B.** 2010. Network genealogy of 195-bp satellite DNA supports the superimposed hybridization hypothesis of *Trypanosoma cruzi* evolutionary pattern. *Infect Genet Evol* 10:601-606.
- Instituto Nacional de Estadística.** Avance del Padrón municipal a 1 de enero de 2012. [Consultado el 1 de marzo del 2012]. Disponible en: <http://www.ine.es/prensa/np648.pdf>.
- Iwai LK, Juliano MA, Juliano L, Kalil J, Cunha-Neto E.** 2005. T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain. *J Autoim* 24:111-117.
- Jannin J, Villa L.** 2007. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Supl 1):95-97.
- Ji MJ, Noh JS, Cho BK, Choo YS, Kim J, Yoon BS.** 2009. Evaluation of SD BIOLINE Chagas Ab rapid kit. *Korean J Lab Med* 29:48-52.
- Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Venencak-Jones C, McCurley TL.** 1993. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am Soc Trop Med Hyg* 48:348-357.
- Junqueira ACV, Chiari E, Wincker P.** 1996. Comparison of polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for diagnosis of Chagas disease patients in a North-eastern endemic regions of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 90:129-132.
- Kalil J, Cunha-Neto E.** 1996. Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: fulfilling the criteria at last? *Parasitol today* 12:396-399.

- Kierszenbaum F.** 1999. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. Clin Microbiol Rev 12:210-223.
- Klein PD, Graham DY, Gaillour A, Opekun AR, Smith EO.** 1991. Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children. Lancet 337:1503-1506.
- Koetzel K, Faleiros JJ, Mendes SR, Stankey CT, Arias HS.** 1973. Concomitant infection of albino mice by *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni*. Parasitological parameters. Trans R Soc Trop Med Hyg 67:652-658.
- Krieger MA, Almeida E, Oelemann W, Lafaille JJ, Pereira JB, Krieger H, Carvalho MR, Goldenberg S.** 1992. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. Am J Trop Med Hyg 46:427-434.
- Kullberg MC, Berzofsky JA, Jankovic DL, Barbieri S, Williams ME, Perlmann P, Sher A, Troye-Blomberg M.** 1996. T cell-derived IL-3 induces the production of IL-4 by non-B, non-T cells to amplify the Th2-cytokine response to a non-parasite antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice. J Immunol 156(4):1482-1489.
- Kullberg MC, Pearce EJ, Hieny SE, Sher A, Berzofsky JA.** 1992. Infection with *Schistosoma mansoni* alters Th1/Th2 cytokine responses to a non-parasite antigen. J Immunol 148(10):3264-3270.
- Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, Radhakrishna S, Leiby D, Herron R, Mone T, Hunter R, Kuehnert M;** Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team. 2009. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. Clin Infect Dis 48(11):1534-1540.
- Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J.** 1985. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. Arq Bras Cardiol 45:249-256.
- Kusters JG, Gerrits MM, Van Strijp JA, Vandenbroucke-Grauls CM.** 1999. Coccoid forms of *Helicobacter pylori* are the morphologic manifestation of

cell death. Infect Immun 65:3672-3679.

Lane JE, Olivares-Villagomez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE. 1997. Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and *in situ* hybridization in infected murine cardiac tissue. Am Soc Trop Med Hyg 56:588-595.

Laucella SA, Mazilah DP, Brtocchi, Alvarez MG, Cooley G, Viotti R, Albareda MC, Lococo C, Postan M, Armenti A Tarleton RL. 2009. *Trypanosoma cruzi*-specific immune responses after treatment: surrogate markers of treatment efficacy. Clin Infect Dis 49:1675-1684.

Leiby DA, Wendwl S, Takaoka DT, Fachini RM, Oliveira LC, Tibbals MA. 2000. Comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercially available indirect immunofluorescence assay indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunoabsorbent assay kits. J Clin Microbiol 38:639-642.

Lent H, Wygodzinsky P. 1979. Revisión of the Triatominae (hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. Bull Am Mus Nat History 163:123-520.

Leon JS, Engman DM. 2001. Autoimmunity in Chagas heart disease. Int J Parasitol 31:555-561.

Levin MJ, da Silveira JF, Frasch AC, Camargo ME, Lafon S, Degraive WM, Rangel-Aldao R. 1991. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. FEMS Microbiol Immunol 4:11-19.

Levy MZ, Bowman NM, Kawai V, Waller LA, Cornejo del Carpio JG, Cordova Benzaquen E, Gilman RH, Bern C. 2006. Periurban *Trypanosoma cruzi*-infected *Triatoma infestans*, Arequipa, Peru. Emerg Infect Dis 12(9):1345-1352.

López R, Muñoz C, Nazar C, Rojas A, Schenone H. 1992. Prevalencia actual de la triquinosis en Santiago, Chile (1992); estudio en 500 cadáveres. Bol Chil Parasitol 47:86-87.

- Luquetti AO.** 1987. Megaesofago e anticorpos anti-*Trypanosoma cruzi*. Rev Goiana Med 33:1-16.
- Luquetti AO, Rassi A.** 2000. Diagnostico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* p. 344-378. En: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M (eds), *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2nd ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Luquetti AO, Tavares SBN, Oliveira RA, Siriano LR, Costa DG, Oliveira EG.** 2008. Sorologia como critério de cura em pacientes tratados com benzonidazol. Títulos obtidos por imunofluorescência indirecta. Rev Soc Bras Med Trop 41:242-243.
- Macedo AM, Pena SDJ.** 1998. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. Parasitology today 14:119-124.
- Machado FS, Tanowitz HB, Teixeira MM.** 2010. New drugs for neglected infectious disease: Chagas' disease. British J Pharmacol 160:258-259.
- Maguire JH.** 2004. *Trypanosoma*, p. 2327-2334. En: Gorbach S, Bartlett J, Blacklow N (eds), Infectious diseases, 2nd ed Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.
- Malaty HM, Graham DY.** 1994. Importance of childhood sócio-economic status on current prevalence of *Helicobacter pylori* infection. Gut 35:742-745.
- Marin-Neto JÁ, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV.** 2007. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. Circulation 115:1109-1123.
- Marshall AJ, Brunet LR, van Gessel Y, Alcaraz A, Bliss SK, Pearce EJ, Denkers EY.** 1999. *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high levels of plasma TNF- α and early death in C57BL/6 mice. J Immunol 163:2089-2097.
- Martin DJ, Slim JG, Sole GJ.** 1995. CD4⁺ Lymphocyte count in African patients coinfectd with HIV and tuberculosis. JAIDS 8:386-391.

- Martin F, Puertas C, Thomas MC, Marañón C, Patarroyo ME, Martin J, Alonso C, López MC.** 1997. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigenic epitope implicated in the infectivity of fibroblast LLC-MK2 cells. *Parasitol Res* 83:226-232.
- Marshall BJ, Warren JR.** 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311-1315.
- McAuley JB, Michelson MK, Schantz PM.** 1991. Trichinosis surveillance, United States, 1987-1990. *MMWR CDC Surveill Summ* 40(3):35-42.
- Medina-Lopes MD.** 1988. Transmission of *Trypanosoma cruzi* in a case, during lactation, in a non-endemic área. *Rev Soc Bras Med Trop* 21:151-153.
- Médicins Sans Frontières.** 2008. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 41:315-319.
- Mendall MA, Goggin PM, Molineaux N, Levy J, Toosy T, Strachan D, Camm AJ, Northfield TC.** 1994. Relation of *Helicobacter pylori* infection and coronary heart disease *Br Heart J* 71(5):437-439.
- Mendes R, Hoshino S, Moura S, Mota I, Heredia R, Luquetti A, Leser PG.** 1997. Serological diagnosis of Chagas' disease: a potencial confirmatory assay using preserved protein antigens of *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 35:1829-1834.
- Miles MA, Feliciangeli MD, de Arias AR.** 2003. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology guiding control strategies. *BMJ* 326:1444-1448.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio LL.** 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136:1509-1528.
- Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loeberberg D, Urbina JA.** 2000. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole)

against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 44(1):150-155.

Mollinedo PS, Prieto BC. 2006. El enteroparasitismo en Bolivia. La Paz-Bolivia: Ministerio de Salud y Deporte, Dirección Nacional de Servicios de Salud, Programa Nacional del Escolar y Adolescente, Unidad de Parasitología INLASA.

Moncayo A, Luquetti AO. 1990. Multicentre Double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 85:489-495.

Moretti E, Basso B, Castro I, Carrizo-Paez M, Barbieri G, Canal-Feijoo D, Sartori MJ, Carrizo-Paez R. 2005. Chagas' disease: study of congenital transmission in cases of acute maternal infection. *Rev Soc Bras Med Trop* 38:53-55.

Morris A, Nicholson G. 1987. Ingestion of *Campylobacter pyloridis* causes gastritis and raised fasting gastric pH. *Amer J Gastroent* 82:192-199.

Mortatti RC, Fonseca LS, Coelho J, Oliveira A, Moreno M. 1992. Follow-up of patent and subpatent parasitemias and development of muscular lesions in mice inoculated with very small numbers of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 75:233-239.

Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 27:1477-1482.

Mott KE, Muniz TM, Lehman JS Jr, Hoff R, Morrow RH Jr, de Oliveira TS, Sherlock I, Draper CC. 1978. House construction, triatomine distribution, and household distribution of seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in northeast Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 27(6):1116-1122.

Muñoz J, Treviño B, Vergés M, Clavería I, López-Chejade P, Salvadó E. 2007. Enfermedad de Chagas importada en Barcelona. *Enferm Infecc Microbiol Clin Supl*(1) 1:87.

- Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, Pino M, Fumado V, Bosch J, Posada EJ, Hernandez S, Fisa R, Boguña JM, Gállego M, Sanz S, Portús M, Gascón J.** 2009. Prevalence and Vertical Transmission of *Trypanosoma cruzi* Infection among Pregnant Latin American Women Attending 2 Maternity Clinics in Barcelona, Spain. Clin Infect Dis 48(12):1736-1740.
- Murcia L, Carrilero B, Muñoz MJ, Iborra MA, Segovia M.** 2010. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. J Antimicrob Chemother 65(8):1759-1764.
- Murcia L, Carrilero B, Muñoz-Davila MJ, Thomas MC, López MC, Segovia M.** 2013. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. Clin Infect Dis 56(4):496-502.
- Murrell KD, Pozio E.** 2000. Trichinellosis: the zoonosis that won't go quietly. Int J Parasitol 30: 1339–1349.
- Murta SM, Nogueira FB, Dos Santos PF, Campos FM, Volpe C, Liarte DB, Nirdé P, Probst CM, Krieger MA, Goldenberg S, Romanha AJ.** 2008. Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. Acta Trop 107:59-65.
- Nacher M.** 2011. Interactions between worms and malaria: good worms or bad worms?. Malar J 10:259-265.
- Nacher M, Gay F, Singhasivanon P, Krudsood S, Treeprasertuk S, Mazier D, Vouldoukis I, Looareesuwan S.** 2000. *Ascaris lumbricoides* infections is associated with protection from cerebral malaria. Parasite Immunol 22:107-113.
- Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, Lisanti MP, Weiss LM, Garg NJ, Tanowitz HB.** 2012. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cell Microbiol 6.
- Nascimento RS, Valente RS, Oliveira LC.** 2002. Seroprevalence de *Helicobacter pylori* infection in chronic chagasic patients, and in rural and

urban population from Uberlandia, Minas Gerais, Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 39:209-212.

Navin TR, Roberto RR, Juranek DD, Limpakarnjanarat K, Mortenson EW, Clover JR, Yescott RE, Taclindo C, Steurer F, Allain D. 1985. Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. Am J Pub Health 75:366-369.

Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN. 2009. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. Emerg Infect Dis 15(4):653-655.

Oliveira LCM, Juliano Y, Novo NF, Neves MM. 1993. Blood glucose and insuline response to intravenous glucose by patients with chronic Chagas' disease and alcoholism. Braz J Med Biol Res 26:1187-1190.

Oliveira LC, Buso AG, Siqueira L, Moraes F, Oliveira HA, Oliveira RM, Salomao EC. 1997. Peptic disease and *Helicobacter pylori* are highly prevalent in patients with the indeterminate form of Chagas' disease: report of 21 cases. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 39:209-212.

Oliveira RB, Troncon LE, Dantas RO, Megenheli UG. 1998. Gastrointestinal manifestations of Chagas disease. Am J Gastroenterol 93:884-889.

Organización Mundial de la Salud. 1991. Informe de un Comité de Expertos de la OMS. Control de la Enfermedad de Chagas. [Serie de Informes Técnicos n°811]. Ginebra: OMS.

Organización Mundial de la Salud. 1999. The World Health Report. Ginebra, 1999.

Organización Mundial de la Salud. 2002. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical report series n° 905. Ginebra: WHO.

Organización Mundial de la Salud. 2003. Control de la enfermedad de Chagas. Ginebra: WHO Press.

Organización Mundial de la Salud. 2005_a. Reporte del grupo de trabajo científico sobre la enfermedad de Chagas. TDR/GTC/09.

Organización Mundial de la Salud. 2005_b. Report of the third global meeting of the partners for parasite control. Geneva: Strategy Development and Monitoring for Parasitic Diseases and Vector Control, Communicable Diseases Control, Prevention and Eradication, Communicable Diseases.

Organización Mundial de la Salud. 2010_b. Control and Prevention of Chagas disease in Europe. Report of a WHO Informal Consultation (jointly organized by WHO headquarters and the WHO Regional Office for Europe) Geneva: WHO. Report n°: WHO/HTM/NTD/IDM/2010.1. Disponible en: http://www.fac.org.ar/1/comites/chagas/Chagas_WHO_Technical%20Report_16_06_2010.pdf.

Organización Mundial de la Salud. 2010_a. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Ginebra. WHO/HTM/NTD/2010.1.

Organización Panamericana de la Salud. 1998. "Situación de las helmintiasis intestinales en América: justificación y perspectivas de control en el contexto de la AIEPI". Reunión sobre el control de las helmintiasis intestinales en el contexto de la AIEPI. Río de Janeiro.

Organización Panamericana de la Salud. 2006. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Americas OPS/HDM/CD/425-06. Organización Panamericana de la Salud, Washintong, DC.

O'Toole PW, Lane MC, Porwollik S. 2000. *Helicobacter pylori* motility. Microbes Infect 2:1207-1214.

Padovan W, Meneghelli UG, Godoy RA. 1977. Gastric secretory and motility studies in chronic chagasic patients. Amer J Dig Dis 22:618-622.

PAHO. 2007. First session of the subcommittee on program, budget, and administration of the executive committee. Washington: Pan American Health Organization world health organization.

Parada C, Drecic MC, Tuset C, Aznar P, Segarra P, García M. 2007. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en inmigrantes

latinoamericanos atendidos en el Hospital General Universitario de Valencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin Supl*(1) 1:87.

Patel P, Mendall MA, Carrington D, Strachan DP, Leatham E, Molineaux N, Levy J, Blakeston C, Seymour CA, Camm AJ. 1995. Association of *Helicobacter pylori* and *Chlamydia pneumoniae* infections with coronary heart disease and cardiovascular risk factors. *BMJ* 311:711-714.

Pearce EJ, Reiner SL. 1995. Induction of Th2 responses in infection diseases. *Curr Op Immunol* 7:497-504.

Peralta JM, Magalhaes TC, Abreu L, Manigot DA, Luquetti A, Dias JCP. 1981. The direct agglutination test chronic Chagas' disease. The effect of pretreatment of test samples with 2-mercaptoethanol. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 75:695-698.

Perez-Perez GI, Rothenbacher O, Brenner H. 2004. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 9 (Suppl 1):1-6.

Petherick A. 2010. Outlook of Chagas disease. *Nature* S10-S11.

Pinazo MJ, Espinosa G, Gállego M, López-Chejade PL, Urbina JA, Gascón J. 2010_a. Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *Am J Trop Med Hyg* 82(4):583-587.

Pinazo MJ, Elizalde JI, Posada EJ, Gascón J. 2010_b. Co-infection with two emergent old pathogens: *Trypanosoma cruzi* and *Helicobacter pylori*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 28:751-752.

Plan Nacional de Sangre del Cordón Umbilical. 2008. Versión aprobada por la Subcomisión de TPH y por la Comisión de Trasplantes del Consejo Interterritorial.

Pless M, Juranek D, Kozarsky P, Steurer F, Tapia G, Bermudez H. 1992. The epidemiology of Chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroreactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis, and domiciliary triatomine distribution. *Am J Trop Med Hyg* 47(5):539-546.

- Ponce C, Ponce E, Vinelli E, Montoya A, de Aguilar V, Gonzalez A, Zingales B, Rangel-Aldao R, Levin MJ, Esfandiari J, Umezawa ES, Luquetti AO, da Silveira JF.** 2005. Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of chagas' disease by detection of *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. J Clin Microbiol 43(10):5065-5068.
- Pounder RE.** 1995. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries. Aliment Pharmacol Ther 9:33-39.
- Pozio E, Murrell KD.** 2006. Systematics and epidemiology of *Trichinella*. Adv Parasitol 63: 367-439.
- Praast G, Herzogenrath J, Bernhardt S, Christ H, Sickinger E.** 2011. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. Diagnostic Microbiol and Infect Dis 69:74-81.
- Prata A.** 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. The Lancet Infect Dis 1:92-100.
- Primavera KSC, Umezawa ES, Peres BA, Camargo ME, Hoshino-Shimizu S.** 1990. Chagas' disease: IgA, IgM, and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, tripomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. Rev Inst Med Trop 32:172-180.
- Rangel-Aldao R, Comach G, Allende O, Cayama E, Delgado V, Piras R, Piras M, Henriquez D, Negri S.** 1986. *Trypanosoma cruzi*: polypeptide markers of epimastigotes and tripomastigotes. Mol Biochem Parasitol 20(1):25-32.
- Rassi A Jr, Rassi SG, Rassi A.** 2001. Sudden death in Chagas' disease. Arc Bras Card 76:75-96.
- Rassi A Jr, Dias JC, Marin-Neto JA, Rassi A.** 2009. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. Heart 95:524-534.
- Rassi A Jr, Rassi A, Rassi SG.** 2010. Chagas disease. Lancet 375:1388-1402.
- Reiner SL, Locksley RM.** 1995. The regulation of immunity to *Leishmania*

major. Annu Rev Immunol 13:151-177.

- Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra A, Schiavelli R, De Rissio A, Maiolo E, García MM, Jacob N, Pattin M, Lauricella M, Segura EL, Vázquez M.** 1999. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. Clin Infect Dis 29(3):561-567.
- Rocha A, Oliveira LCM, Alves RS, Lopes ER.** 1998. Despopulação neuronal pancreática em chagásicos crônicos. Rev Soc Bras Med Trop 31:43-49.
- Rocha JRM, Ribeiro U, Cecconello I, Sallum RAA, Takeda F, Nasi A, Szachnowicz S.** 2009. Gastric secretory and hormonal patterns in end-stage chagasic achalasia. Dis Esophagus 22:606-610.
- Roddy P, Goiri J, Flevaud L, Palma PP, Morote S, Lima N, Villa L, Torrico F, Albajar-Viñas P.** 2008. Field evaluation of a rapid immunochromatographic assay for detection of *Trypanosoma cruzi* infection by use of whole blood. J Clin Microbiol 46:2022-2027.
- Rodrigues J.** 2009. Present situation and new strategies for Chagas' disease chemotherapy – a proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz 104(4):549-554.
- Rodríguez M, Terrazas L, Márquez R, Bojalil R.** 1999. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. Parasite Immunol 21:177-185.
- Rodríguez MN, Queiroz DMM, Rodríguez RT, Rocha AMC, Braga Neto BM, Braga LLBC.** 2005. *Helicobacter pylori* infection in adults from a poor community in northeastern Brazil: Demographic, lifestyle and environmental factors. Braz J Infect Dis 9:405-420.
- Romanello LM, Troncon LE, Barbieri-Neto J, Moreira AC, de Oliveira RB, Módena JL.** 1991. Tissue levels of 6-ketoprostaglandin F1 alpha and integrity of gastric mucosa in patients with Chagas disease. Arq Gastroenterol 28(4):132-138.
- Russomando G, Almirón M, Candia N, Franco L, Sánchez Z, de Guillen I.** 2005. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in

endemic areas of Paraguay. Rev Soc Bras Med Trop 38 (Suppl 2):49-54.

Salas NA, Cot M, Schneider D, Mendoza B, Santalla JA, Postigo J, Chippaux JP, Brutus L. 2007. Risk factors and consequences of congenital Chagas disease in Yacuiba, south Bolivia. Trop Med Int Health 12:1498-1505.

Saldaña A, Sousa OE. 1996. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. J Parasitol 82:363-366.

Salinas A, Gorgolas M, Fernández-Guerrero M. 2007. Refrain from telling bad news: patients with leishmaniasis can have false-positive HIV test results. Clin Infect Dis 45:139-140.

Sánchez B, Monteon V, Reyes PA, Espinoza B. 2001. Standardization of micro-enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) and Western blot for detection of *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from Mexican strains as antigens. Arch Med Res 32:382-388.

Santos IS, Boccio J, Davidsson L, Hernandez-Triana M, Huanca-Sardinas E, Janjetic M, Moya-Camarena SY, Paez-Valery MC, Ruiz-Alvarez V, Valencia ME, Valle NC, Vargas-Pinto G, Solano L, Thomas J. 2009. *Helicobacter pylori* is not associated with anaemia in Latin America: results from Argentina, Brazil, Bolivia, Cuba, Mexico and Venezuela. Public Health Nutr 12(10):1862-1870.

Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar G, Zulantay I, Lucero RO, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Z, Galvao L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from chagas disease patients. PLoS Negl Trop Dis 5(1):e931.

- Schmunis GA.** 1991. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 31:547-557.
- Schmunis GA.** 1999. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Supl 1):93-101.
- Schmunis GA.** 2007. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102 (Supl 1):75-85.
- Schmunis GA, Cruz JR.** 2005. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev* 18:12-29.
- Schofield L.** 1991. On the function of repetitive domains in protein antigens of *Plasmodium* and other eukaryotic parasites. *Parasitol Today* 7:99-105.
- Schofield CJ, Dias JC.** 1999. The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv parasitol* 42:1-27.
- Shapiro AE, Tukahebwa EM, Kasten J, Clarke SE, Magnussen P, Olsen A, Kabatereine NB, Ndyomugenyi R, Brooker S.** 2005. Epidemiology of helminth infections and their relationship to clinical malaria in southwest Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 99:18-24.
- Solari A, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, Salinas P, Rojas A, Schenone H.** 2001. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother* 48:515-519.
- Soriano Arandes A, Muñoz Gutierrez J, Verges Navarro M, Castells Domenech C, Portus Vinyeta M, Gascón Brustenga J.** 2009. Prevalence of Chagas disease in the Latin America immigrant population in a primary health centre in Barcelona (Spain). *Acta Trop* 112:228-230.
- Sosa-Estani S, Gamboa-León MR, Del Cid-Lemus J, Althabe F, Alger J, Almendares O, Cafferata ML, Chippaux JP, Dumonteil E, Gibbons L, Padilla-Raygoza N, Schneider D, Belizán JM, Buekens P; Working Group.** 2008. Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for

Trypanosoma cruzi infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. Am J Trop Med Hyg 79(5):755-759.

Souto RP, Fernandez O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. 1996. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 83:141-152.

Souza FF, Castro-E-Silva O, Marin Neto JA, Sankarankutty AK, Teixeira AC, Martinelli AL, Gaspar GG, Melo L, Figueiredo JF, Romano MM, Maciel BC, Passos AD, Rossi MA. 2008. Acute chagasic myocardiopathy after orthotopic liver transplantation with donor and recipient serologically negative for *Trypanosoma cruzi*: a case report. Transplant Proc 40(3):875-878.

Stevenson MM, Tam F. 1993. Differential induction of helper T cell subsets during blood stage *Plasmodium chabaudi* AS infection in resistant and susceptible mice. Clin Exp Immunol 92:77-83.

Strout RG. 1962. A method for concentrating hemoflagellates. J Parasitol 48:100.

Thomas MC, Longobardo MV, Carmelo E, Marañón C, Planelles L, Patarroyo ME, Alonso C, López MC. 2001. Mapping of the antigenic determinants of the *T. cruzi* kinetoplastid membrane protein-11. Identification of a linear epitope specifically by human Chagasic sera. Clin Exp Immunol 123:465-471.

Thomas MC, Fernández-Villegas A, Carrilero B, Marañón C, Saura D, Noya O, Segovia M, de Noya B, Alonso C, López MC. 2012. Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology. Clin Vaccine Immunol 9(2):167-73.

Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, Lana M. 2003. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother 47:223-230.

- Toledo MJ, Bahia MT, Veloso VM, Carneiro CM, Machado GL, Alves CF, Martins HR, Cruz RE, Tafuri WL, Lana M.** 2004. Effects of specific treatment on parasitological and histopathological parameters in mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. J Antimicrob Chemother 53: 1045-1053.
- Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y.** 2004. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. Am J Trop Med Hyg 70:201-209.
- Torrico F, Castro M, Solano M, Rodriguez P, Torrico MC, Truyens C, Carlier Y.** 2005. Effects of maternal infection with *Trypanosoma cruzi* in pregnant development and in the newborn infant. Rev Soc Bras Med Trop 38 (Supl 2):73-76.
- Triana O, Ortiz S, Dujardin JC, Solari A.** *Trypanosoma cruzi*: Variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. Exp Parasitol 113:62-66.
- Troncon LEA, Oliveira RB, Meneghelli UG, Dantas RO, Godoy RA.** 1984. Fasting and food-stimulated plasma gastrin levels in chronic Chagas' disease. Digestion 29:171-176.
- Tyler KM, Engman DM.** 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. International Journal for Parasitology 31:472-481.
- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira AC, Camargo ME.** 1996. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol 34(9):2143-2147.
- Umezawa ES, Bastos SF, Camargo ME, Yamauchi LM, Santos MR, Gonzalez A, Zingales B, Levin MJ, Sousa O, Rangel-Aldao R, da Silveira JF.** 1999. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas' disease in South and Central America. J Clin Microbiol 37(5):1554-1560.

- Umezawa ES, da Silveira JF.** 1999. Serological diagnosis of Chagas disease with purified and defined *Trypanosoma cruzi* antigens. Mem Inst Oswaldo Cruz 94 (Suppl. 1):285-288.
- Umezawa ES, Luquetti AO, Levitus G, Ponce C, Ponce E, Henriquez D, Revolto S, Espinoza B, Sousa O, Khan B, da Silveira JF.** 2004. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. J Clin Microbiol 42:449-452.
- Urbina JA, Docampo R.** 2003. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol 19:495-501.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D.** 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. Antimicrob Agents Chemother 42:1771-1777.
- Vargas N, Pedroso A, Zingales B.** 2004. Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. Mol Biochem Parasitol 138:131-141.
- Vasileva K.** 2009. Statistics in focus. Citizens of European countries account for the majority of the foreign population in EU-27 in 2008. Luxembourg: Eurostat; Report n°94/2009. Disponible en: http://epp.eurostat.ec.europa.eu/cache/ITY_OFFPUB/KS-SF-09-094/EN.PDF.
- Venturiello SM, Caminoa RA, Veneroni R, Costantino SN, Giambartolomei GH, Ledesma M, Scandurra N.** 1993. Aspectos serológicos, clínicos y epidemiológicos de un brote de triquinosis en Azul, provincia de Buenos Aires. Medicina (Buenos Aires) 53:1-5.
- Verani JR, Seitz A, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Kawai V, de LaFuente E, Ferrufino L, Bowman NM, Pinedo-Cancino V, Levy MZ, Steurer F, Todd CW, Kirchhoff LV, Cabrera L, Verastegui M, Bern C.** 2009. Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop

Med Hyg 80(3):410-415.

Vianna GO. 1911. On pathologic anatomy in Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 3:276-294.

Villa L, Morote S, Bernal O, Bulla D, Albajar-Viñas P. 2007. Access to diagnosis and treatment of Chagas disease/infection in endemic and non-endemic countries in the XXI century. Mem Inst Oswaldo Cruz 102:87-93.

Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. 1994. Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. Am Heart J 127:151-162.

Voltarelli JC, Falcao RP. 1995. Inmunodeficiencias secundarias. Medicina 28:329-377.

Wendel S, Brener Z. 1992. Historical aspects, p.5-12. En: Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds), Chagas disease-American trypanosomiasis: its impact on transfusion and clinical medicine. International Society of Blood Transfusion, Brazil, Sao Paulo.

Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. 1994. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am J Trop Med Hyg 51:771-777.

Winkler MA, Brashear RJ, Hall HJ, Schur JD, Pan AA. 1995. Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. II. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for confirmation of seroreactivity. Transfusion 35(3):219-225.

Woolley DW, Merrifield RB. 1963. Anomalies of the structural specificity of peptides. Ann NY Acad Sci 104:161-171.

Zamorano CG, Contreras MC, Sánchez A, Bahamondes MA, Sandoval L. 1991. Estudio seroepidemiológico de la hidatidosis y triquinosis humana, mediante la reacción de hemaglutinación indirecta, en la Comuna de San

Juan de la Costa. Osorno, X Región, Chile. 1990-1991. Bol Chil Parasitol 46:82-84.

Zarlenga DS, Rosenthal B, La Rosa G, Pozio E, Hoberg EP. 2006. An old genus learns new tricks: late Tertiary colonization and speciation of *Trichinella* nematodes among Eutheria. Proc Nat Acad Sci U.S.A. 103:7354–7359.

Zingales BA, Gruber A, Ramalho CB, Umezawa ES, Colli W. 1990. Use of recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 85:519-522.

Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Maedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrene M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 104:1051-1054.

Zweig MA, Campbell G. 1993. Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. Clin Chem 39:561-577.