



**Tesis para optar por el título científico de
Máster en Parasitología**

**Detección de Unidades Discretas de Tipificación de
Trypanosoma cruzi en muestras clínicas y su
asociación con el origen geográfico y la presentación
clínica**

Autora: Lic. Niurka E. Tamayo Pérez

Tutor: Lic. Jorge Fraga Nodarse, DrC

La Habana

2024

**Centro de investigaciones, diagnóstico y referencia
Departamento de Parasitología**

Tesis para optar por el título científico de Máster en Parasitología

**Detección de Unidades Discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* en
muestras clínicas y su asociación con el origen geográfico y la presentación
clínica**

Autora: Lic. Niurka E. Tamayo Pérez

Tutor: Lic. Jorge Fraga Nodarse, DrC

La Habana, 2024

Agradecimientos:

Todos sabemos que llevar a término este tipo de trabajo no se hace solo, así que a quien me apoyó, se preocupó y extendió una mano amiga cuando lo necesité, gracias.

Listado de abreviaturas y unidades de medidas

- EC: Enfermedad de Chagas
- Tc: *Trypanosoma cruzi*
- UDT: Unidades Discretas de Tipificación
- PCR: *Polimerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
- RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción)
- HRM: *High Resolution Melting* (Análisis de alta resolución de fusión)
- ARN: *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)
- ADN: *Deoxyribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)
- HMCOAR: 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa
- GPI: Glucosa-6-fosfato isomerasa
- TcMPX: Peroxidasa mitocondrial
- SSU-rRNA: Subunidad pequeña del ARN ribosomal
- gGAPDH: Gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa glicosomal
- HSP70: Proteína de choque térmico de 70 kDa
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPS: Organización Panamericana de la Salud
- IFI: Inmunofluorescencia indirecta
- HAI: Hemaglutinación indirecta
- ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensayo inmunoenzimático en fase sólida)
- RDT: *Rapid Diagnostic Test* (Pruebas de diagnóstico rápido)
- ADNk: minicírculos del kinetoplasto
- LAMP: *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (Amplificación isotérmica mediada por bucles)
- qPCR: PCR en tiempo real
- CMIA: Inmunoensayos Magnéticos Quimioluminiscentes
- CCC: Cardiomiopatía chagásica crónica
- MLEE: *Multilocus enzyme electrophoresis* (Análisis múltiple de enzimas mediante electroforesis)
- RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA* (ADN polimórfico amplificado al azar)
- ELAM: Escuela Latinoamericana de Medicina
- MINSAP: Ministerio de Salud Pública
- IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”
- U: Unidad
- μL : micro litros
- mM: mili molar
- μM : micro molar
- %: porcentaje
- kDa: kilodalton
- $^{\circ}\text{C}$: grados Celsius.

ÍNDICE

Resumen.....	7
1. Introducción.....	8
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo General.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. Revisión Bibliografica.....	14
3.1. Clasificación Taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.2. Características Morfológicas de los estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
3.2.1. Epimastigote.....	17
3.2.2. Tripomastigote.....	17
3.2.3. Amastigote.....	18
3.3. Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i>	18
3.4. Fases, formas y evolución clínica.....	19
3.5. Diagnóstico.....	21
3.5.1. Examen microscópico.....	22
3.5.2. Aislamiento del agente.....	23
3.5.3. Métodos serológicos.....	23
3.5.4. Diagnóstico molecular.....	25
3.6. Epidemiología.....	27
3.7. Vectores de la Enfermedad de Chagas.....	29
3.8. Formas de transmisión.....	30
3.9. Tratamiento.....	32
3.10. Epidemiología Molecular de <i>T. cruzi</i>	34
4. Materiales y métodos.....	40
4.1. Tipo de estudio.....	40
4.2. Universo de trabajo.....	40
4.2.1. Cepas de referencia de <i>Trypanosoma spp</i>	40
4.2.2. Muestras clínicas.....	40
4.3. Identificación de las UDT de <i>T. cruzi</i> mediante la RCP-RFLP <i>hsp70</i> UDT.....	41
4.4. Determinación del porcentaje de tipificación de la técnica de PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT en muestras clínicas.	43
4.5. Operacionalización de las variables.....	43
4.6. Asociación de las UDT detectadas con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad.....	44
4.7. Consideraciones éticas.....	44
5. Resultados.....	47
5.1. Características de los pacientes estudiados.....	47
5.2. Identificación de las UDT mediante la técnica de PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT en las muestras clínicas de pacientes con EC.....	48

5.3. Determinación del porcentaje de tipificación de la técnica de PCR-RFLP hsp70 UDT...	49
5.4. Asociación de las UDT de T. cruzi con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad	50
6. Discusión.....	53
7. Conclusiones.....	67
8. Recomendaciones.....	68
9. Referencias bibliográficas.....	69

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, el protozoo causante de la enfermedad de Chagas (EC), exhibe una sorprendente diversidad intraespecífica genética y fenotípica, junto con una complejidad ecoepidemiológica. Este parásito se ha subdividido en siete linajes genéticos o unidades discretas de tipificación (UDTs), llamadas TcI-TcVI y TcBat. Las interacciones entre humanos y patógenos conducen a presentaciones clínicas distintas de la enfermedad. La discriminación de los linajes se ha convertido en un tema importante en la epidemiología molecular de *T. cruzi*. Existen muchos reportes que muestran algoritmos para la caracterización molecular de estas UDTs, pero hoy en día no existe un protocolo de consenso para la identificación de los genotipos. Se están realizando investigaciones para optimizar la sensibilidad y simplificar las técnicas de tipificación para que se puedan aplicar más fácilmente, directamente a partir de muestras clínicas y biológicas, que sean manejables en cualquier laboratorio y adoptadas por la comunidad científica de investigaciones de *T. cruzi*. En nuestras condiciones se evaluó la técnica de la Reacción en Cadena de la polimerasa – Restricción del Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción basado en el gen *hsp70* UDT (PCR-RFLP *hsp70* UDT), previamente diseñada y optimizada en nuestro laboratorio, en 193 muestras clínicas de pacientes humanos recolectados de Argentina, Bolivia, Belice, Colombia y México. La PCR-RFLP *hsp70* UDT permite la tipificación de los linajes de parásitos directamente a partir de muestras clínicas de humanos en el 48,7% de las muestras estudiadas, aunque necesita la combinación con otra herramienta molecular para diferenciar las UDT V y IV. Las distribuciones de las UDT encontradas en las muestras clínicas analizadas corresponden con los que se ha reportado en los países estudiados. Al asociar las UDT con las manifestaciones clínicas en los pacientes encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el UDT TcI y la forma cardíaca, la UDT TcV o VI con la forma digestiva y no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los UDTs y la forma indeterminada. Presentamos así un método de PCR-RFLP que permite la identificación de UDT de *T. cruzi* en base a una única PCR. La técnica es simple de realizar y se puede implementar en todos los entornos donde la PCR esté disponible.

Palabras claves: *Trypanosoma cruzi*, Enfermedad de Chagas, *hsp70*, UDT, PCR, PCR-RFLP, epidemiología molecular.

1. INTRODUCCIÓN

La Tripanosomiasis Americana o Enfermedad de Chagas (EC) es una enfermedad zoonótica, endémica en 21 países de Centro y Sudamérica. Su agente etiológico es el parásito protozoario hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, el cual se transmite principalmente a través de vectores hematófagos pertenecientes a la familia Reduviidae del orden Hemiptera de la subfamilia Triatominae, comúnmente conocidos como vinchucas o chinche besucona (Carbajal de la Fuente et al., 2022). Esta enfermedad puede presentarse de forma aguda o crónica. La primera suele ser breve y repentina ocasionando fiebre, dolor de cabeza o una hinchazón en el sitio de la lesión y en algunos casos puede ser asintomática, de no ser tratada puede convertirse en un trastorno duradero. Su etapa crónica se presenta en algunos casos 10 o 20 años después de la infección inicial presentando manifestaciones cardíacas, digestivas o ambas (Carlier et al., 2019; Echeverría et al., 2020; De Souza et al., 2024). Recientemente una revisión sistemática dio a conocer que el 42,6 % de los pacientes con EC se encuentran en la fase crónica indeterminada (asintomática), el 42,7 % en la fase crónica cardíaca, el 17,7% de los pacientes en la forma crónica digestiva y el 10,2 % de los pacientes presentan la forma crónica cardíaca y digestiva (Ramos et al., 2024).

Todas las especies de Triatominae son potencialmente capaces de transmitir *T. cruzi* a los humanos, pero los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* son los vectores epidemiológicamente más relevantes de la EC. Se infectan al alimentarse de la sangre de un animal (roedores, murciélagos, primates, etc.) con parásitos *T. cruzi* circulantes en forma de tripomastigotes. Cuando se ingieren, evolucionan a epimastigotes en el estómago de los triatomas y posteriormente, a tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino grueso. Cuando el vector se alimenta de un animal sano, libera estos tripomastigotes en sus heces, cerca del lugar de la picadura, de modo que pueden penetrar a través de la herida o incluso de una mucosa intacta, como la conjuntiva ocular. Una vez dentro del huésped (animal o humano), los tripomastigotes invaden las células y se diferencian en amastigotes intracelulares que se multiplican por fisión binaria. Estos amastigotes pueden volver a diferenciarse en tripomastigotes y liberarse al torrente sanguíneo (Teixeira et al., 2012; De Souza et al., 2024).

En las Américas, la EC muestra una incidencia anual de 30.000 casos como promedio, 12.000 muertes por año y aproximadamente 9.000 recién nacidos se infectan durante la gestación. Se estima que alrededor de 70 millones de personas en las Américas viven expuestas y en riesgo de contraer la EC (Lindani et al., 2019; Lascano et al., 2022; Giancola et al., 2024; Nute-Quiroz y Moreno Perez, 2024; WHO, 2024). La enfermedad es extremadamente compleja porque el parásito *T. cruzi* puede mantener su ciclo biológico en una gran cantidad de especies vectores y reservorios y tiene varias rutas de transmisión (Liu y Zhou, 2015; de Fuentes-Vicente 2018). Aunque la vía de transmisión más relevante a humanos es la vectorial (> 80 % de las infecciones registradas), la cual ocurre en países donde los triatomineos son endémicos o están presentes. Otra vía de transmisión en humanos que también depende de la presencia de

vectores es la transmisión oral a través de alimentos y bebidas contaminados con heces de triatomíneos y se han descrito numerosos brotes de infección por transmisión oral en países donde la EC es endémica (Carlier et al., 2019; Echeverría et al., 2020). El parásito también puede transmitirse por transmisión vertical (2 % - 40 % de los recién nacidos) debido a una infección congénita transplacentaria de madres embarazadas que pueden transmitir el parásito en cualquier etapa de la infección y en cualquier momento durante el embarazo, incluido el parto. Otras vías de transmisión son la transfusión de sangre (alrededor del 10 % de los casos), el trasplante de órganos, los accidentes de laboratorio biomédico y la manipulación de animales infectados o la ingestión de su carne cruda. Si bien es cierto que la prevalencia de la EC se ha reducido en la última década en los países endémicos, se ha incrementado dramáticamente el número de casos en países no-endémicos, lo que hace de esta enfermedad un problema de salud mundial (Pinazo et al., 2015; Connors et al., 2016; Lindani et al., 2019; Giancola et al., 2024; Nute-Quiroz y Moreno Perez, 2024; WHO, 2024).

Las migraciones humanas, han constituido un factor crítico para la emergencia de la EC en áreas donde no se había descrito previamente la enfermedad (Connors et al., 2016; Nute-Quiroz y Moreno Perez, 2024; WHO, 2024). Así se han detectado casos en países no-endémicos de América del norte (Estados Unidos y Canadá), Europa (principalmente España), Mediterráneo Oriental y la región del pacífico (Australia, Nueva Zelanda y Japón). En estos países la enfermedad se ha convertido en un problema de salud importante, al observarse un número creciente de individuos infectados. En áreas no endémicas la transmisión ocurre a través de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos de donadores infectados. La transmisión congénita de la madre al niño durante el embarazo es otra vía de adquirir la enfermedad en países no endémicos (Lindani et al., 2019; Antinori et al., 2022; Gonzalez-Sanz et al., 2023; Iglesias-Rus et al., 2023; Torres Martínez et al., 2023; Wirth et al., 2023; Llovera et al., 2024)

En Cuba hasta el momento, no se reportan casos autóctonos de tripanosomiasis americana. Sin embargo, existe el riesgo de transmisión vectorial al encontrarse en la isla 4 especies de Triatomíneos: *Triatoma flavida* (Neiva, 1911), *T. bruneri* (Usinger, 1944), *Bolboderia scabrosa* (Valdés, 1990) y *T. rubrofasciata* (De Geer, 1973). La última especie es un reconocido vector cosmopolita y junto a *T. flavida*, probados transmisores de *T. cruzi* en condiciones de laboratorio (Hernández y Gonzales, 2006). A este riesgo se une el constante flujo de personas procedentes de áreas endémicas de la enfermedad, la presencia en el país de estudiantes latinoamericanos que provienen de los 21 países endémicos, la demostración de la presencia de la enfermedad en algunos estudiantes (Ruiz et al., 2010; Serra et al., 2012; Delgado et al., 2016) y la estancia de cubanos por largos períodos de tiempo en estos países endémicos donde pueden entrar en contacto con el vector o con la enfermedad (Torres et al., 2011).

Trypanosoma cruzi, constituye un grupo monofilético, pero genéticamente heterogéneo (Tibayrenc, 2010). Basado en el análisis de varios marcadores genéticos y evolutivos y en la interpretación de datos genéticos de la población, se han clasificado las poblaciones de *T. cruzi*

en seis unidades discretas de tipificación (UDT), nombradas desde TcI a TcVI (Zingales et al., 2009). Recientemente, un séptimo grupo detectado en murciélagos y denominado TcBat ha sido añadido a esta clasificación (Lima et al., 2015; Zingales, 2018; Zingales y Bartholomer, 2022).

En los últimos años, se ha avanzado en el estudio de la comprensión de la genética y diversidad del parásito, proporcionando información acerca de la evolución, el comportamiento biológico y los patrones epidemiológicos; la historia natural de la infección; y problemas relacionados con el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad a partir del análisis de aislamientos de diferente origen geográfico y hospederos (Brenière et al., 2016; Zingales, 2018; Zingales y Bartholomer, 2022; Zingales y Macedo, 2023; Silvestrini et al., 2024). De forma general, se concluyó que TcI predominó en la muestra general analizada (alrededor del 60 %), tanto en ciclos selváticos como domésticos. Este linaje, conocido por presentar una alta diversidad genética, está ampliamente distribuido geográficamente, compatible con una evolución a largo plazo. Se cree que el marsupial es su huésped más ancestral y la región del Gran Chaco (área geográfica ubicada en el centro-sur de América del Sur que se extiende por parte de los actuales territorios de Argentina, Bolivia, Brasil y Paraguay) el lugar de su supuesto origen. La TcII se detectó en este estudio rara vez (9,6 %), está ausente o es extremadamente rara en América del Norte y Central, y se identificó con mayor frecuencia en ciclos domésticos que en ciclos selváticos. Tiene una baja diversidad genética y probablemente encontró refugio en algunas especies de mamíferos. Se cree que se originó en el área sur-amazónica. Por su parte, los linajes TcIII y TcIV también fueron poco detectados, mostraron una diversidad genética sustancial y se cree que están compuestos de posibles subgrupos polifiléticos. Incluso, aunque se asociaron principalmente con ciclos de transmisión selvática, se han informado un total de 150 infecciones humanas con estas UDT. Finalmente, los linajes TcV y TcVI están claramente asociados con los ciclos de transmisión domésticos. Menos del 10 % de estas UDT, se identificaron juntas en huéspedes selváticos. Una brecha de conocimiento importante en este estudio, fue no haber encontrado una asociación entre el genotipo del parásito y la manifestación clínica de la EC en la fase crónica (Brenière et al., 2016). Como consecuencia de las diferencias genotípicas y fenotípicas de las cepas de *T. cruzi* y la distribución geográfica diferencial de las UDT en humanos, si se verificaron variaciones regionales en la sensibilidad de las pruebas serológicas. La resistencia natural al benznidazol y al nifurtimox, verificada *in vitro* e *in vivo* para algunos aislamientos de parásitos, no está asociada con ninguna UDT en particular, y no explica la diferencia marcada en la eficacia antiparasitaria de ambos fármacos en las fases aguda y crónica de la EC (Zingales, 2018; Zingales y Bartholomer, 2022; Zingales y Macedo, 2023; Silvestrini et al., 2024). El amplio debate existente sobre el tema, hace necesario continuar los estudios de detección de UDT en muestras clínicas, vectores y reservorios de países endémicos y no-endémicos de la enfermedad, para correlacionar los mismos con el origen geográfico, la presentación clínica, la susceptibilidad a los métodos de diagnóstico utilizados y la sensibilidad a los antiparasitarios.

Diferentes métodos moleculares han permitido la detección y diferenciación de las UDT de *T. cruzi* directamente a partir de muestras clínicas, vectores y reservorios (Cura y Shijman, 2013); en los que se incluyen los métodos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa convencional (PCR, siglas del inglés *Polimerase Chain Reaction*) (Souto y Zingales, 1993; Clark y Pung, 1994; Souto et al., 1996; Brisse et al., 2001; Burgos et al., 2007; Falla et al., 2009; Burgos et al., 2010), la PCR anidada (Bontempi et al., 2016), la PCR- Polimorfismo de los Fragmentos de Restricción (PCR-RFLP, siglas del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Burgos et al., 2007; Rozas et al., 2007; Cosentino et al., 2012; Fraga et al., 2014; Fraga 2022; Morales, 2023) y la técnica de PCR en tiempo real (Piron et al., 2007; Duffy et al., 2009; Moreira et al., 2013; Cura et al., 2015; Muñoz-San Martín et al., 2017) y la misma acoplada al análisis de alta resolución de fusión (HRM, siglas del inglés *High Resolution Melting*) (Freitas et al., 2005; Higuera et al., 2013).

De la misma forma, diferentes blancos genéticos han sido utilizado en los métodos moleculares antes mencionados como son: mini-exon (Burgos et al., 2007), regiones intergénicas para minixon (SL-IR) (Burgos et al., 2007), subunidad grande ARN ribosomal 24S (Souto y Zingales, 1993; Souto et al., 1996), subunidad pequeña del ARN ribosomal 18S (Clark y Pung, 1994), fragmento nuclear A10 (A10) (Burgos et al., 2007), citocromo oxidasa subunidad II (COII) (de Freitas et al., 2006), proteína de unión a GTP similar a Rho (RHO1), 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMCOAR), glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), peroxidasa mitocondrial (TcMPX) (Diosque et al., 2014), los minicírculos del ADN del kinetoplasto (Bontempi et al., 2016) y el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*) (Fraga et al., 2014; Fraga et al., 2016; Fraga 2022; Morales et al., 2023).

De forma general, se utilizan flujogramas o esquemas de tipificación de secuencias multilocus que combinan un método molecular con diferentes blancos genéticos o juegos de cebadores o tres o más métodos moleculares diferentes, con diferentes blancos genéticos, de los antes mencionados. Con estos, se llega a determinar el linaje del parásito a partir de aislamientos o directamente a partir de muestras clínicas de pacientes, vectores y reservorios (D'Ávila et al., 2009; Lewis et al., 2009; Burgos et al., 2010; Diosque et al., 2014; Lima et al., 2014; Cura et al., 2015). Nuestro grupo de trabajo en el Departamento de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK), desarrolló la técnica de RCP-RFLP *hsp70* UDT, que en su evaluación inicial permitió la tipificación de los linajes de parásitos directamente a partir de 55 muestras clínicas de humanos, reservorios animales y triatomíneos de diferentes orígenes geográficos en aproximadamente un 50 % de las muestras estudiadas (Fraga 2016; 2022; Morales, 2023). Sin embargo, es necesario evaluar un mayor número de muestras clínicas con el objetivo de completar la evaluación diagnóstica de la técnica propuesta y definir el porcentaje de tipificación de la misma directamente a partir de muestras clínicas sobre todo de la fase crónica de la enfermedad. Además, contribuir a los estudios que se desarrollan con el fin de asociar los linajes del parásito con el origen geográfico y las manifestaciones o formas clínicas de la enfermedad.

Teniendo en cuenta estos elementos se propone utilizar la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT, para la identificación de los linajes del parásito en un grupo de muestras clínicas de pacientes con EC en etapa crónica procedentes de países endémicos de la enfermedad y asociar los linajes del parásito con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad durante un periodo de septiembre de 2023 a julio de 2024, en un grupo de muestras clínicas bien caracterizadas que forman parte del Banco de muestras del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo General

Identificar mediante PCR-RFLP *hsp70* UDT los linajes de *T. cruzi* en muestras clínicas de pacientes de diferentes orígenes geográficos y su asociación con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar las UDTs mediante la técnica PCR-RFLP *hsp70* UDT en las muestras clínicas de pacientes con EC.
- Determinar el porcentaje de tipificación de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT.
- Asociar las UDTs de *T. cruzi* con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad.

3. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3.1. Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la Enfermedad de Chagas, cuya clasificación taxonómica es la siguiente (Levine et al., 1980; Schochet al., 2020; Carbajal de la Fuente et al., 2022):

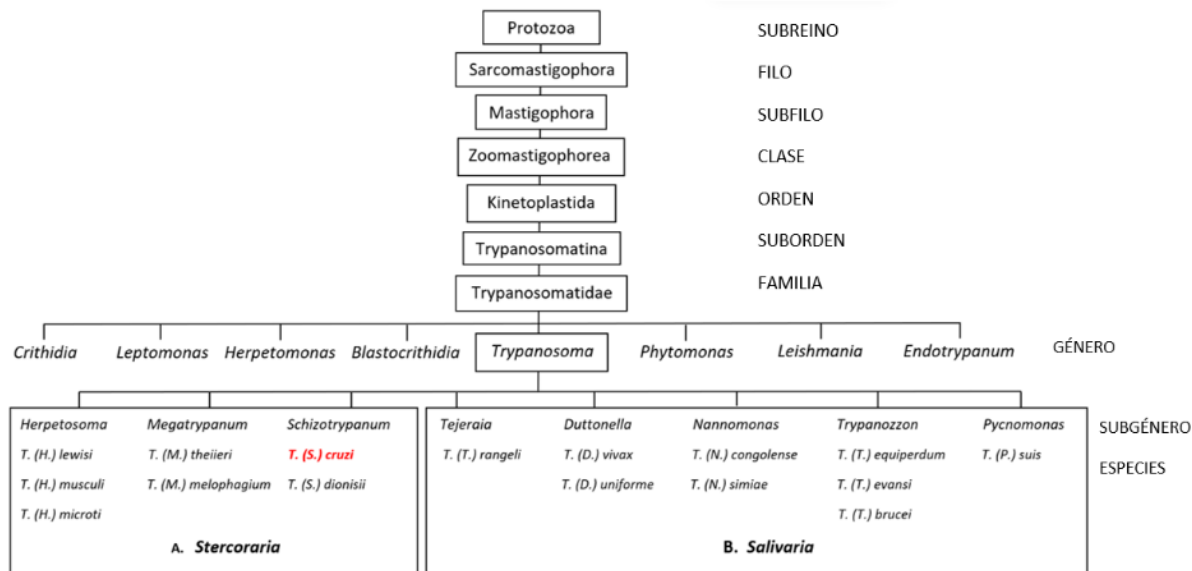


Figura. 1. Clasificación de tripanosomas en mamíferos, editada a partir del texto Altchehy Freilij, 2019.

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes debido a que incluye especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, que causa la EC, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño en el hombre y al igual *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*, que causan la enfermedad en animales (Carbajal de la Fuente et al., 2022).

El género *Trypanosoma* se considera un grupo monofilético, compartiendo un ancestro común que data de hace unos 100 millones de años (Barrett et al., 2003; Stevens y Gibson, 1999). La clasificación establecida por Hoare se basó en la morfología y el desarrollo en el vector (Hoare, 1972). Las especies de *Trypanosoma* que infectan mamíferos se separaron en dos secciones: Salivaria y Stercoraria. Los tripanosomas de la sección Salivaria se subdividieron en cinco subgéneros: *Trypanozoon*, *Duttonella*, *Nannomonas*, *Tejeraia* y *Pycnomonas*. La división Stercoraria comprendió tres subgéneros: *Schizotrypanum*, *Megatrypanum* y *Herpetosoma* (Vickerman, 1976;). Como algunos de estos grupos son polifiléticos y carecen de relevancia evolutiva y taxonómica, algunos autores han sugerido, más recientemente, clasificar el género

en clados filogenéticos, basado en el análisis de la subunidad pequeña del ARN ribosomal (SSU-rRNA) y la gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa glicosomal (gGAPDH) (Simpson et al., 2006; Stevens y Gibson, 1999; Stevens y Rambaut, 2001). A pesar de la información proporcionada por el análisis de secuencias de ADN, la filogenia del género *Trypanosoma* y sus relaciones evolutivas no han sido firmemente establecidas (Hughes y Piontkivska, 2003; Kelly et al., 2014; Votýpka et al., 2015). Recientemente, Fraga y colaboradores (2016, 2021) realizaron el análisis filogenético del género *Trypanosoma* basado en el análisis de las secuencias del gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) solo y combinado con otros marcadores genéticos (subunidad menor ARNr (SSU-ADNr)+ gliceraldehido 3´fosfato deshidrogenasa (gGADPH) +hsp70). Este estudio apoyó la clasificación de las especies de *Trypanosoma* en clados en lugar de secciones y subgéneros. Se reconocieron nueve clados: *Trypanosoma carassi*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. grayi*, *T. lewisi*, *T. rangeli*, *T. theileri*, *T. vivax* y *Trypanozoon* (Figura 1) resultando consistentes con el conocimiento existente de la filogenia del género (Fraga et al., 2016; Fraga et al., 2021)

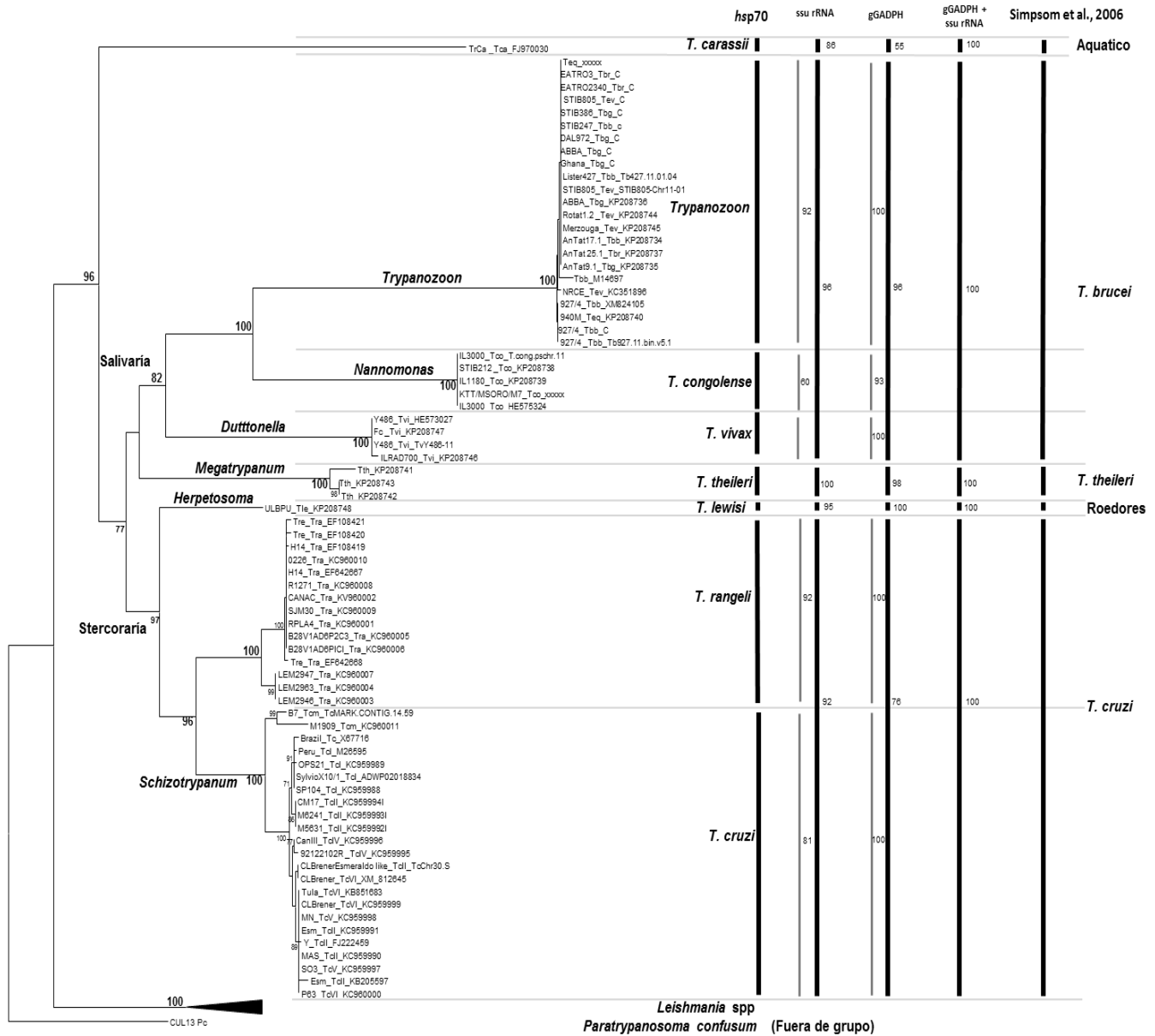


Figura 2. Árbol filogenético de la UDT *hsp70* de 11 especies de *Trypanosoma*. El análisis se realizó con X secuencias de X países mediante Neirhijbor Joing y modelo evolutivo Kimura 2 parámetros. Los valores de Bootstrap inferidos a partir de 2000 repeticiones y mayores del 70% se muestran en los nodos, y para los análisis con máxima parsimonia y máxima verosimilitud para cada grupo respectivo (segundo y tercer valor) respectivamente. Como grupos externos se utilizaron secuencias de *Paratrypanosoma confusum* y *Leishmania* spp. A la izquierda se indican las diferentes clasificaciones según subgénero clásica de Hoare (1972), las secciones de Stercoraria y Salivaria y los clados propuestos por Simpson et al. (2006) y grupos monofiléticos de otros informes están representados a la derecha por líneas verticales, para SSU-rDNA (Cavazzana et al., 2010; Stevens y Gibson, 1999); gGADPH (Hamilton et al., 2004); y SSUrDNA + gGADPH (Lima et al., 2013).

3.2. Características morfológicas de los estadios de *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosoma cruzi presenta tres estadios epimastigote, tripomastigote y amastigote (Figura 3), que se detectan fácilmente por microscopía de campo claro según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brenner, 1973).

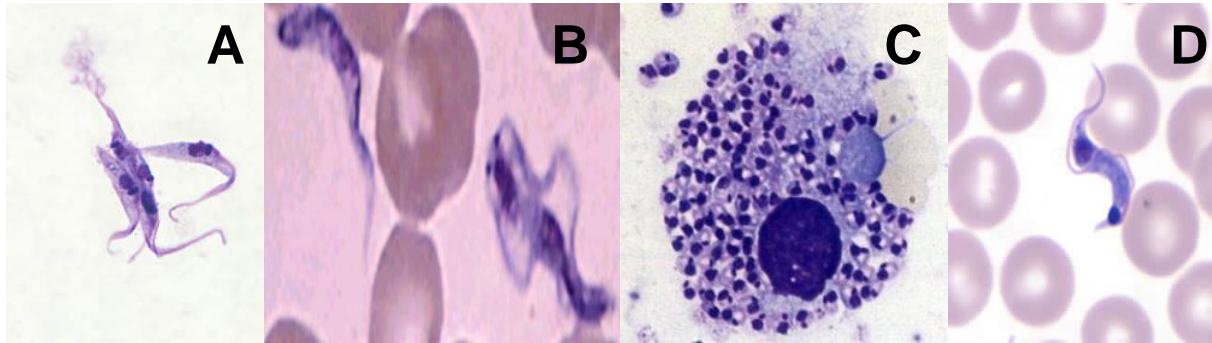


Figura 3. Estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. A) Epimastigotes, B) Tripomastigote metacíclico, C) Amastigotes en el interior de una célula muscular, D) Tripomastigote sanguíneo en sangre periférica. Tomado de CDC, 2019 (Paba et al., 2004).

3.2.1. Epimastigote.

Es la forma flagelada replicativa y no infectiva que se encuentra en el intestino medio del insecto vector. Posee forma ahusada, un tamaño de 20-40 x 2 μm y el núcleo es redondeado. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular. Se divide por fisión binaria y a diferencia de los demás estadios, puede cultivarse en medio axénico (Figura 3A).

3.2.2. Tripomastigote.

Es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospederos (Figura 3B y D). Es de forma elongada y mide aproximadamente 20 μm de longitud. Posee una membrana ondulante en uno de sus lados, el flagelo emerge del extremo apical posterior, su núcleo es alargado y el kinetoplasto se encuentra ubicado posterior al mismo. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero, y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las formas infectivas. Los tripomastigotes sanguíneos y los tripomastigotes metacíclicos tienen forma similar, y comparten algunas propiedades biológicas. Sin embargo, los tripomastigotes sanguíneos poseen la capacidad de transformarse en epimastigotes a 27 °C en sangre o medio axénico, propiedad que está ausente en los metacíclicos. Además, ambas formas del parásito poseen antígenos en estadios específicos y presentan diferentes modos de interactuar con las células hospederas (Paba et al., 2004).

3.2.3. Amastigote.

Es la forma no flagelada, esférica u ovalada (2-4 μ m), que se localiza intracelularmente en vacuolas acídicas y que es replicativa en el citoplasma del mamífero hospedero (Ley et al., 1990) (Figura 3C).

3.3. Ciclo de vida del *T. cruzi*.

Este ciclo comienza cuando el insecto vector infectado por el parasito se alimenta con la sangre del hospedero mamífero y luego defeca sobre la zona afectada. Los tripomastigotes metacíclicos contenidos en las heces del triatomíneo penetran a través de la piel lesionada, pasan al torrente sanguíneo e invaden un amplio rango de células nucleadas (Tyler y Engman, 2001; Saraiva et al., 2021). Una vez en el citoplasma de la célula, el tripomastigote comienza a sufrir el proceso de diferenciación a amastigote: su flagelo se acorta y se hace casi inexistente y el cuerpo y el núcleo vuelven a tomar forma redondeada. Unas 24 a 35 horas después de su entrada al citosol, el amastigote comienza a dividirse activamente por fisión binaria y llega a formar pseudo-quistes dentro de la célula. Cuando ya existe una alta densidad de parásitos intracelulares, los amastigotes se diferencian a tripomastigotes sanguíneos que salen de la célula infectada, pasan a la sangre o a la linfa del mamífero y pueden invadir nuevas células (Tyler y Engman, 2001; Burleigh y Woolsey, 2002; Martín-Escolano et al., 2022). El ciclo de vida del parásito se cierra cuando el insecto vector se alimenta con la sangre de un mamífero infectado. Dicha sangre contiene tripomastigotes sanguíneos que, al llegar al intestino del triatomíneo se diferencian a epimastigotes. Los tripomastigotes metacíclicos por su parte, provienen de la diferenciación de epimastigotes. Cuando estos llegan al recto del insecto vector, se adhieren a través de su flagelo mediante interacciones hidrofóbicas a la cutícula de la pared intestinal. Finalmente se despegan de la pared intestinal y son eliminados en las heces del vector (Brenner, 1971; Tyler y Engman, 2001; Rassi et al., 2012, Texeira et al., 2012) (Figura 4).

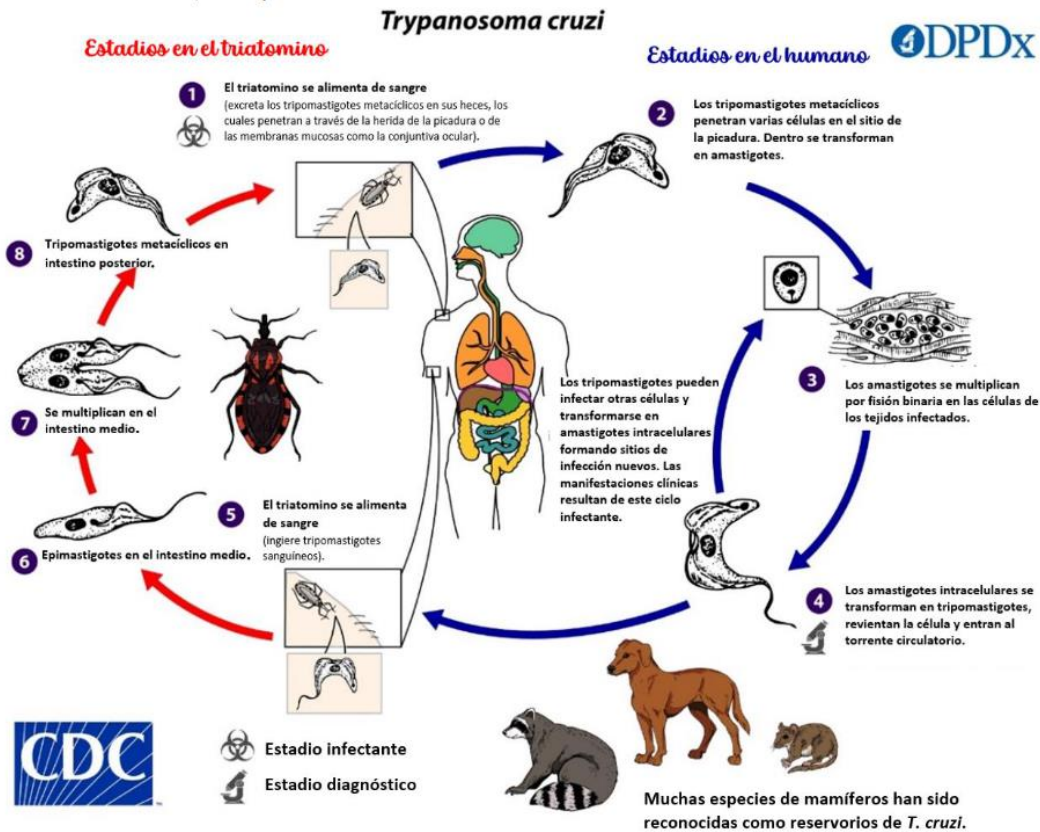


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de CDC, 2019.

3.4. Fases, formas y evolución clínica.

La infección humana por *T. cruzi* presenta un período de incubación que varía en dependencia de la forma de transmisión. La forma vectorial entre 5 y 14 días, la oral 5 días, la transfusional entre 30 y 110 días, la congénita entre 4 y 9 meses (Lescure et al., 2010). Posteriormente, sobreviene la fase aguda que usualmente es asintomática o puede presentarse como una enfermedad febril auto limitada donde la parasitemia es relativamente alta. En esta fase puede presentarse la aparición de una pequeña lesión en el sitio de la picadura denominada chagoma de inoculación, que, si está a nivel de la conjuntiva, puede producir un edema duro bipalpebral unilateral, con dacrioadenitis e inflamación del gangliopreauricular denominado signo de Romaña (Suárez et al., 2022).

Las manifestaciones de la enfermedad aguda se resuelven de manera espontánea en el 90 % de los individuos infectados, aun cuando la infección no es tratada (Figura 5). La fase aguda dura 4-8 semanas, y la parasitemia disminuye sustancialmente de 90 días en adelante. Aun así, la enfermedad aguda grave ocurre en menos de 1-5 % de los pacientes e incluye manifestaciones tales como miocarditis aguda, derrame pericárdico y meningoencefalitis. En esta fase las muertes ocurren ocasionalmente, como resultado de miocarditis severa, meningoencefalitis o ambas (< 5- 10 % de los casos sintomáticos) (Rassi et al., 2010).

Seguidamente los pacientes pasan a una forma crónica indeterminada de la enfermedad, la cual se caracteriza por la positividad de anticuerpos contra el parásito y resultados normales de electrocardiogramas y exámenes radiológicos de tórax, colon y esófago (Figura 5). En esta fase el tratamiento con fármacos antiparasitarios puede usualmente curar la infección entre un 20 a un 60 % de los casos (Rassi et al., 2010). Alrededor del 60 al 70 % de los pacientes en esta fase nunca desarrollan clínicamente la enfermedad y por lo tanto son el grupo más grande de pacientes afectados. El resto de los pacientes (30- 40 %) desarrollan la forma determinada de la fase crónica caracterizada por una forma cardíaca, digestiva (megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva entre 10 a 30 años después de iniciada la infección provocando la muerte del paciente (Dias, 1995). Los resultados de estudios recientes han demostrado una progresión a la afectación cardíaca de alrededor de 1,4-5,0% por año (Machado-de-Assis et al., 2013). La afectación cardíaca es el tipo más frecuente y grave de afectación de órganos, ocurre en el 14-45% de los pacientes infectados crónicamente (Salvador et al., 2014) y afecta principalmente el sistema de conducción del impulso nervioso y el miocardio. La afectación gastrointestinal es menos frecuente (10-21%) y ocurre con mayor periodicidad en el Cono Sur de Sudamérica (Salvador et al., 2014). En esta fase el tratamiento con drogas antiparasitarias (benznidazol) tiene resultados de cura mucho menores que en el caso de la forma indeterminada (Rassi et al., 2010) (Figura 5).

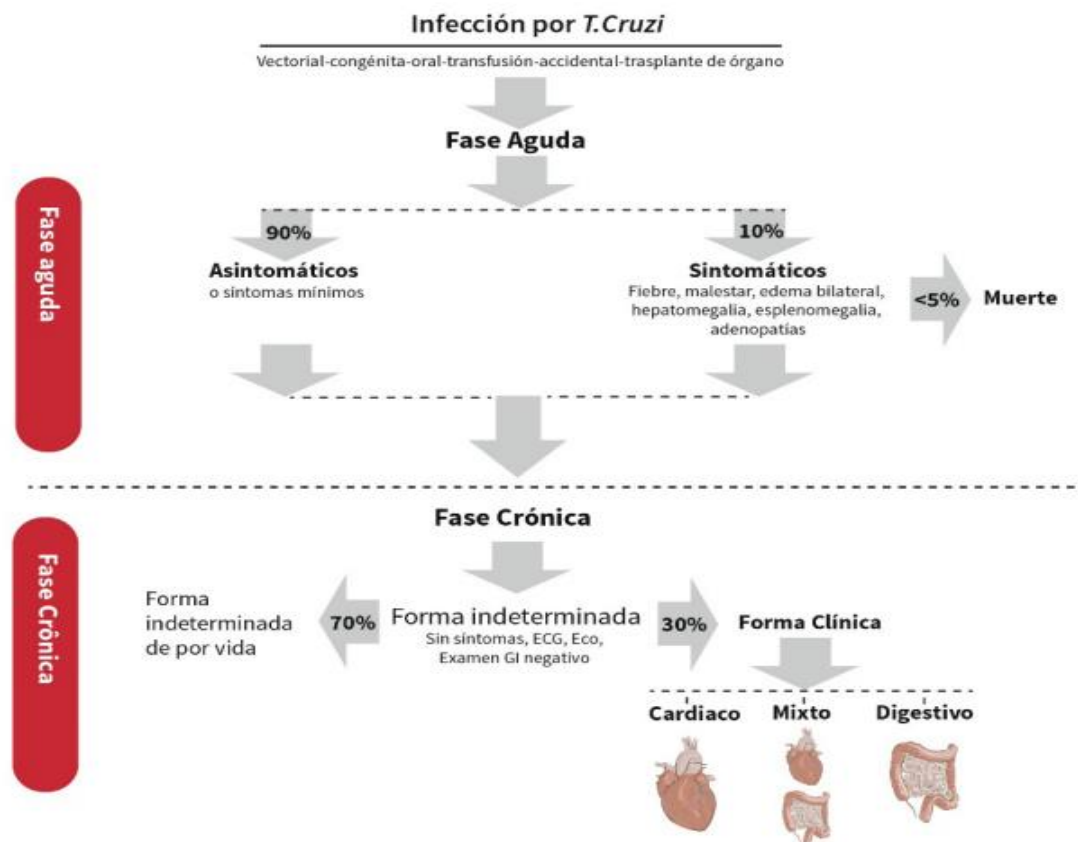


Figura 5. Historia natural y fases de la Enfermedad de Chagas en el humano. (Echevarría et al., 2020).

Pueden existir la infección congénita donde la mayoría de los recién nacidos son asintomáticos o tienen síntomas leves, pero una minoría puede presentar una enfermedad grave que amenaza la vida (Bittencourt et al., 1975). Se estima que el 28% de los lactantes infectados por *T. cruzi* presentan síntomas clínicos y el 2,2% progresa hasta la muerte (Matthews et al., 2022). La enfermedad de Chagas congénita es considerada un *T. cruzi* infección en la fase aguda. La evolución se observa particularmente en contextos de transmisión en las primeras semanas de embarazo o en la presencia de parasitemia elevada (de Sousa et al., 2024).

La transmisión oral a través de alimentos o bebida contaminada con heces de triatomíneos parece causar una enfermedad más grave, con una mayor mortalidad que las enfermedades transmitidas por vectores (Pereira y Navarro, 2008; Shikanai Yasuda et al., 2013).

3.5. Diagnóstico

El diagnóstico de la infección por *T. cruzi* depende de la fase de la enfermedad y se debe apoyar en la información tanto epidemiológica como clínica del paciente, así como en las pruebas de laboratorio (Lescure et al., 2010; Rassi et al., 2010; Candia-Puma et al., 2022). En la fase aguda y en la enfermedad congénita de EC el diagnóstico de laboratorio se basa en la observación del parásito presente en la sangre de los individuos infectados dada la constante presencia del parásito en esa etapa. Actualmente se emplean los métodos parasitológicos, y se están introduciendo pruebas moleculares estandarizadas para proporcionar una mayor sensibilidad y menos dependencia del operador (Candia-Puma et al., 2022).

En la fase crónica de la enfermedad, indeterminada o determinada, el diagnóstico parasitológico directo resulta comprometido por la baja e intermitente parasitemia. Los métodos parasitológicos indirectos (xenodiagnóstico o hemocultivo) que pueden ser utilizados, presentan baja sensibilidad (de 20 a 50%). De esta forma, el diagnóstico en la fase crónica es esencialmente serológico (Candia-Puma et al., 2022). Al presente se utilizan ensayos serológicos basados en IgG, pero si un solo ensayo no alcanza la precisión requerida, la OPS/OMS recomienda al menos dos pruebas inmunológicas con principios técnicos diferentes (Rodrigues et al., 2022).

Para diagnosticar infecciones congénitas se aplican algoritmos específicos examinando los donantes de sangre y órganos o realizar estudios epidemiológicos (Shikanai Yasuda et al., 2022).

La detección de la reactivación de la enfermedad de Chagas en individuos inmunodeprimidos es un área de creciente interés (Schijman et al., 2022).

Para establecer un mismo algoritmo para todos los países endémicos o no endémicos en el 2018 la OPS elaboró una Guía para el Diagnóstico y Tratamiento de la EC. La misma consta

lineamientos para el manejo de infecciones por *T. cruzi* con el objetivo de fortalecer la implementación de políticas y el manejo de sus condiciones clínicas (OPS, 2020). La guía brinda estrategias para el diagnóstico oportuno y tratamiento de la EC, así como consideraciones para la implementación de dichas estrategias (OPS, 2020). Las diez recomendaciones son aplicables a pacientes adultos y pediátricos con sospecha de EC, exposición a *T. cruzi* o un diagnóstico confirmado de EC aguda, crónica o congénita (Guyatt et al., 2011).

Cinco de las recomendaciones se dirigen al diagnóstico (OPS, 2020):

(i) ¿En pacientes con sospecha de *T. cruzi* crónico en infección, ¿cuál es la mejor estrategia diagnóstica (una o dos técnicas serológicas)?

En estos casos, se recomienda utilizar el “regla de oro diagnóstica”, que es la combinación de dos pruebas serológicas utilizando diferentes antígenos capaces de detectar anti-*T. cruzi* anticuerpos (ELISA, IHA, IIF), y una tercera prueba si los resultados de dichas pruebas son discordantes.

(ii) En el marco de las encuestas seroepidemiológicas para detectar pacientes con enfermedad de Chagas crónica, ¿cuál es la mejor estrategia diagnóstica?

Se recomienda emplear ELISA o pruebas de inmunocromatografía para estudios epidemiológicos de la EC. Existe un alto grado de confianza y correlación entre el ELISA o RDT, como ensayos únicos, fácilmente aplicables en estos estudios epidemiológicos.

(iii) ¿Cuál es el mejor método de diagnóstico en bancos de sangre?

Se recomienda utilizar juego de ELISA de alta sensibilidad o inmunoensayos magnéticos quimioluminiscentes (CMIA).

(iv) ¿En pacientes con sospecha de infección aguda por *T. cruzi* (congénita o adquirida recientemente), cuales métodos diagnósticos son los más útiles?

En estos casos, la OPS recomienda el uso de pruebas parasitológicas y eventual seguimiento serológico (en infección congénita después de los ocho meses de edad y en infecciones causadas por otras vías de transmisión, se debe buscar la seroconversión).

3.5.1. Examen microscópico

Las pruebas parasitológicas directas utilizadas son el examen de sangre fresca, frotis y gota gruesa. Los parásitos se pueden observar a través de un examen de sangre fresco simple o en frotis de sangre delgados y gruesos coloreados con Giemsa (sensibilidad 34–85%). Si estas pruebas fueran negativas, deben usarse métodos de concentración. Las pruebas de concentración (microhematocrito o *Strout*) presentan de 80 a 90% de positividad y son recomendados en el caso de fuerte sospecha de EC aguda y negatividad de la prueba directa con sangre fresca (Lescure et al., 2010; Suárez et al., 2022).

T. cruzi se puede encontrar en el corazón, en las células del músculo liso o de los músculos esqueléticos y en las células gliales del sistema nervioso, a veces también en los chagomas.

En los pacientes inmunodeprimidos, los parásitos también se pueden detectar en zonas atípicas como el líquido pericárdico, médula ósea, cerebro, piel y los ganglios linfáticos.

Es mucho más probable que la parasitemia activa se manifieste durante la fase aguda que durante la fase crónica. Se pueden examinar frotis de sangre gruesos o finos, pero la morfología del parásito es más clara en los frotis finos (Molina et al., 2016; Pérez-Molina y Molina, 2018).

3.5.2. Aislamiento del agente

Trypanosoma cruzi se puede cultivar a partir de tejidos o las muestras de sangre heparinizadas. Se pueden utilizar diversos medios especializados que incluyen medio de infusión de hígado y triptosa o medio de Novy-MacNeal-Nicolle, además de las líneas celulares Vero. El cultivo puede demorar entre 1 y 6 meses. El agente también se puede aislar al inocular la sangre en un cobayo, ratón o una rata; este procedimiento es con frecuencia exitoso en casos crónicos.

El xenodiagnóstico se considera la prueba de oro cuando está disponible. En este procedimiento, se permite que los insectos triatomíneos de laboratorio libres de *T. cruzi* se alimenten de una persona infectada; los parásitos se pueden encontrar en el contenido intestinal del insecto entre 1 y 2 meses más tarde. Debido a que estos métodos de diagnóstico son lentos, exigen un trabajo intensivo y requieren personal altamente capacitado, por lo general se utilizan únicamente para confirmar un diagnóstico, si otras pruebas quedan inconclusas, en investigación, o para aislar cepas de parásitos (Molina et al., 2016; Pérez-Molina y Molina, 2018).

3.5.3. Métodos serológicos

Las técnicas serológicas se basan en el uso de antígenos obtenidos de parásitos enteros y extractos purificados (pruebas convencionales) y en antígenos recombinantes y péptidos sintéticos (pruebas no convencionales). Las técnicas más comunes utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación indirecta (HAI) y el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA (Candia-Puma et al., 2022). En un meta-análisis realizado por Candia-Puma y colaboradores (2022), la técnica de IFI mostró una sensibilidad promedio de 78 % (74-78%) y una especificidad de 99 % (83-100%). Por su parte la HAI mostró valores de sensibilidad promedio de 75 % (53-99%) y especificidad promedio de 99% (92-100%), mientras que las técnicas de ELISA mostraron una sensibilidad y especificidad promedio de 85% (sensibilidad 78-88%, especificidad 83-100%).

Recientemente se han ido incorporando las pruebas de diagnóstico rápido (RDT, por sus siglas en inglés) las cuales son fáciles de usar y requieren técnicamente menos tiempo que las

técnicas serológicas clásicas. Muchas de ellas se pueden realizar en suero o con un volumen muy pequeño de sangre entera, y se pueden almacenar por más de un año (Rodrigues et al., 2022). Su uso a gran escala podría contribuir a un mayor acceso al diagnóstico, un mejor tratamiento-cobertura y una reducción de la transmisión de enfermedades. Sin embargo, a pesar de haber sido comúnmente utilizado para las encuestas de campo, la OMS no recomienda las RDT (Angheben et al., 2019). Globalmente, un meta-análisis realizado por Angheben y colaboradores (2019) mostró que la sensibilidad de las RDT examinadas fue buena (superior al 95 %; rango 91,3- 98,7%) y la especificidad fue excelente (>99%; rango 98,24-99,70%), independientemente de su uso en regiones endémicas o no endémicas (Angheben et al., 2019).

La Organización Panamericana de la Salud (OPS)/OMS recomienda considerar positivos a EC a aquellos individuos que tienen dos pruebas serológicas positivas. Este diagnóstico debe ser realizado utilizando dos pruebas serológicas de principios metodológicos diferentes y antígenos diferentes (OPS, 2020). Los resultados serológicos pueden ser discordantes y las muestras pueden dar resultados persistentes y no concluyentes (3% en un laboratorio clínico general). A continuación, se indica un tercer ensayo para aclarar el estado de la infección. Técnicas como la transferencia de Western Blot pueden resultar útiles en estas circunstancias, especialmente en países donde las especies de *Leishmania* son endémicas (Riera et al., 2012; Suárez et al., 2022).

Dada la alta sensibilidad y la especificidad del ELISA, una sola prueba puede ser suficiente para el cribado, por lo que la confirmación serológica sólo es necesaria en el caso de un resultado positivo (Brasil et al., 2010). Las pruebas diagnósticas rápidas (por ejemplo, ensayos inmunocromatográficos que utilizan proteínas recombinantes) no son lo suficientemente sensibles para ser utilizadas como primera prueba, sin embargo, estas pruebas y el uso de muestras de sangre seca son una buena opción para los pacientes que tienen dificultades para acceder a los centros de salud o cuando se necesita tamizaje a gran escala (Sánchez-Camargo et al., 2014; Rodrigues et al., 2022).

El diagnóstico serológico presenta algunas limitantes, por ejemplo, no es útil en los casos sospechosos de Chagas congénito en recién nacidos durante el periodo neonatal, ni en individuos inmunocomprometidos en los cuales la producción de anticuerpos es escasa. Por otra parte, debido al mantenimiento de una respuesta de anticuerpos, estos resultan de poca utilidad en la definición del criterio de cura y de forma general presentan baja especificidad debido a la posibilidad de reacciones cruzadas con otros parásitos fundamentalmente *Leishmania* spp. y *T. rangeli* (Chiaramonte et al., 1999; Corredor Arjona, 1999).

Trypanosoma rangeli constituye el segundo parásito del género *Trypanosoma* que infecta humanos al igual que animales domésticos y salvajes en América Central y del Sur, se considera no patógeno para el hospedero vertebrado (incluyendo humano) (Vallejo et al., 2003).

Este parásito comparte con *T. cruzi* la distribución geográfica, así como características biológicas e inmunológicas tales como: reservorios animales, vectores y determinantes antigénicos, de ahí que hoy constituye un serio problema en la epidemiología y el diagnóstico de EC, por tanto, es de gran importancia el desarrollo de metodologías que permitan el diagnóstico diferencial de las dos especies del parásito (Cuba Cuba, 1998; Gulh y Vallejo, 2003).

3.5.4. Diagnóstico molecular

Las limitaciones en la sensibilidad y especificidad de las pruebas parasitológicas y serológicas de laboratorio, especialmente cuando se trata del diagnóstico de la fase crónica, explican el interés y la necesidad de contar con un método directo más sensible que permita monitorear la presencia del parásito y confirmar la etiología de la enfermedad (Gil et al., 2007; Schijman et al., 2011). En este sentido, la principal técnica que se ha utilizado en la investigación de *T. cruzi*, directamente en la sangre de pacientes con EC, es el ensayo molecular por la PCR, basado en el empleo de oligonucleótidos sintéticos que amplifican secuencias de ADN específicas del patógeno-blanco (Vallejo, 1998; Gulh et al., 2002).

Diferentes secuencias blanco se han utilizado para el diagnóstico molecular de EC, entre ellas se encuentran los minicírculos del kinetoplasto (ADNk) (Sturm et al., 1989; Avila et al., 1991; 1993; Breniere et al., 1995), la región nuclear repetitiva de 195pb (Moser et al., 1989; Díaz et al., 1992; Kirchoff et al., 1996), los minixones (Murthy et al., 1992; Souto et al., 1996), el ARNr 24S (Souto et al., 1993); la proteína flagelar F29 (Souto et al., 1999), la región repetitiva de 1025pb (Requena et al., 1992) y la histona H2A (Gil et al., 2007). Sin embargo, la secuencia más ampliamente usada en los ensayos de PCR son los minicírculos de los kinetoplastos (Virreira et al., 2003).

Para el caso de la infección aguda, la PCR es más sensible que el hemocultivo y el xenodiagnóstico y ha demostrado ser muy útil en el diagnóstico de la transmisión de madre a hijo, siendo más sensibles que las técnicas de concentración (Bua et al., 2013).

Para el diagnóstico de infección crónica por *T. cruzi*, la PCR tiene sensibilidad variada que oscila entre el 2% y el 99% (76% promedio) (Candia-Puma et al., 2022). Esta variabilidad en la sensibilidad y especificidad del PCR dependen de un grupo de factores técnicos tales como: el volumen de la muestra colectada, las condiciones y la conservación de la muestra, el método utilizado para la extracción del ADN, la secuencia del parásito y los cebadores seleccionados, los reactivos empleados, así como, las condiciones en el termociclador. La variabilidad de la sensibilidad de la PCR también se ha explicado en parte por la presencia intermitente y cantidad de parásito circulante en el momento en que se colecta la muestra de sangre, fase de infección, presencia de inmunosupresión, país de origen del paciente y diversidad genética de *T. cruzi* (Schijman et al., 2011). Sin embargo, la PCR puede ser útil cuando los resultados de

serología no son concluyentes, para monitorear la detección temprana del fracaso del tratamiento, y en el manejo de pacientes inmunosuprimidos (Batista et al., 2010; Blum-Dominguez et al., 2011; Molina et al., 2014; Morillo et al., 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018; Candia-Puma et al., 2022).

Otros métodos de PCR como la PCR en tiempo real (qPCR) se han ido introduciendo en el diagnóstico de la EC. En el meta-análisis presentado por Candia-Puma y colaboradores (2022), la qPCR mostró el mejor rendimiento entre los métodos de diagnóstico molecular, con una media de sensibilidad y especificidad de 94,0 y 98,0%, respectivamente (Candia-Puma et al., 2022).

Otra técnica es utilizada más recientemente es la técnica de Amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP), un sistema molecular sensible y específico. Método que es más simple, rápido y económico que la PCR y sus variantes y, por tanto, debe utilizarse en el diagnóstico de EC (Flores-Chávez et al., 2021). Esta técnica ha sido revelada recientemente como una alternativa con gran potencial para el diagnóstico en zonas endémicas (Besuschio et al., 2019) En los últimos años se han descrito avances en cuanto a nuevas metodologías LAMP para el diagnóstico de EC (Besuschio et al., 2019). Sin embargo, estas herramientas de laboratorio aún se están desarrollando y se necesitan mayores cantidades de reactivos y materiales, lo que podría aumentar el valor del diagnóstico en comunidades que viven en zonas endémicas. Sin embargo, aún no se ha aclarado el papel de LAMP en el diagnóstico de la EC (Pascual-Vázquez et al., 2023).

Se ha afirmado que la eficacia diagnóstica de las técnicas moleculares es alta en la EC aguda, mientras que en la fase crónica las técnicas inmunológicas son más efectivas (Ferrer et al., 2013); al comparar el ELISA a los métodos de qPCR en el diagnóstico de los resultados agudos de EC, no se demostró diferencia. La qPCR para *T. cruzi* ha sido validada analíticamente, pero aún no ha sido clínicamente validado para evaluar su utilidad clínica (Duffy et al., 2013), mientras que recientemente el uso combinado de técnicas serológicas y qPCR permitieron identificar la mayor prevalencia de EC en humanos, en comparación con el uso de una sola de estas herramientas de detección (Chan-Pérez et al., 2022).

No existe consenso sobre cuál es el protocolo molecular más eficaz para el diagnóstico de la EC. Desde el punto de vista clínico, la complejidad de la enfermedad de Chagas y sus fases hace imposible tener una prueba única para ambas fases y una cantidad diferente de escenarios epidemiológicos (Schijman et al., 2011; Ramírez et al., 2015). A pesar de la disponibilidad de tantas pruebas, no existe consenso sobre el establecimiento de técnicas de referencia y ninguna prueba se considera la regla de oro estándar para confirmar el diagnóstico de infección por este parásito debido a la complejidad de la enfermedad de Chagas. Las dificultades diagnósticas y terapéuticas que presenta esta parasitosis sistémica obligan a

continuar fortaleciendo la implementación de estrategias y recomendaciones sobre el manejo de la tripanosomiasis, como la actualización de guías clínicas (OPS, 2020).

Los resultados de una revisión sistemática y metanálisis publicado recientemente por Pascual-Vázquez y colaboradores (2023) mostró que el conjunto de técnicas moleculares presentaba una sensibilidad agrupada del 84,9% (IC 95% 82–87,6) para la fase aguda y una especificidad agrupada del 98,5% (IC 95% 97,8–99), al analizar los métodos moleculares utilizados, la sensibilidad combinada en los estudios de PCR/qPCR fue 84% (IC 95% 80–87) versus 94% (IC 95% 86–98) en los estudios que utilizaron la técnica de LAMP, por su parte la especificidad fue la misma (98%) en la PCR/qPCR y en los estudios que utilizaron la técnica de LAMP. Sin embargo, para la fase crónica se encontró una sensibilidad del 67% (IC 95% 65,4–68,5) con una especificidad agrupada muy alta del 98,5% (IC 95% 97,8–99). En los estudios de PCR/qPCR, la sensibilidad agrupada fue del 68% (IC del 95%: 66-70; $I^2=95,2\%$, $P<0,001$), y la especificidad combinada fue del 98% (95% IC 98–99; $I^2=66,6\%$, $P<0,001$); en los estudios que utilizan la técnica de LAMP, la sensibilidad combinada fue del 48% (IC del 95%: 40-55; $I^2=0\%$, $P = 0,644$), y la especificidad combinada fue del 100 % (IC del 95 % 92-100; $I^2=0\%$, $P=1.000$).

De forma general esta revisión sistemática indica lo siguiente:

- 1) En pacientes crónicos, el rendimiento de las técnicas moleculares no es lo suficientemente bueno para el diagnóstico. En pacientes en fase aguda, la confiabilidad aumenta significativamente. Estos resultados apoyan la conclusión de que las técnicas moleculares se pueden aplicar para la rutina diagnóstico en pacientes en fase aguda, pero el uso simultáneo de técnicas moleculares y serológicas se recomienda para pacientes crónicos.
- 2) Entre las diferentes técnicas moleculares analizadas se observa una alta variabilidad en la eficacia diagnóstica. La parasitemia es una de los factores limitantes más importante que influye en la eficacia diagnóstica, y además es una condición muy variable en cada paciente. Asimismo, los diferentes protocolos aplicados en las pruebas moleculares involucran una gran cantidad de factores que podrían incrementar las diferencias en los resultados.
- 3) Los resultados descritos en este metanálisis (análisis cualitativos y cuantitativos) no permiten la selección del protocolo óptimo de método molecular para el estudio de la infección por *Trypanosoma cruzi* en cualquiera de sus fases, entre otras razones por la complejidad de esta infección.

3.6. Epidemiología

La tripanosomiasis americana es endémica en 21 países continentales de América Latina, desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina y Chile (Figura 6). Según las últimas estimaciones realizadas por la OMS, entre 6 a 7 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* fundamentalmente en los países endémicos de América Latina y hay unos 70

millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (Lascano et al., 2022; Giancola et al., 2024; Nute-Quiroz y Moreno Perez, 2024; WHO, 2024). De manera global, el 13 % de toda la población latinoamericana está en condiciones de riesgo de adquirir la enfermedad. Tradicionalmente, está confinado a las zonas rurales pobres de América Central y del Sur, donde la transmisión vectorial es la principal vía de contagio. Los residentes de casas infestadas están continuamente expuestos a picaduras de vectores, y la incidencia de infección por *T. cruzi* es inferior al 0,1 % y puede llegar hasta el 4 % anual en regiones hiperendémicas como el Chaco boliviano (Samuels et al., 2013). Las mayores tasas de prevalencia se han reportado en Bolivia (6,75–15,4 %), seguida de Paraguay (0,69–9,3 %) y Panamá (0,01–9,02 %). Sin embargo, el número total de casos en Brasil (0,8–1,30 %), México (0,5–6,8 %), y Argentina (4,13–8,2 %), en conjunto representan el 60 % de todas las personas infectadas con *T. cruzi* en América Latina (Liu y Zhou, 2015; Suárez et al., 2022; Nute-Quiroz y Moreno Perez, 2024; WHO, 2024).

Desde comienzos de la década de 1990, las medidas más eficaces para el control de la enfermedad de Chagas en América Latina son los programas de control de vectores y las pruebas obligatorias en bancos de sangre (Yamagata y Nakagawa, 2006). Por consiguiente, la prevalencia ha disminuido sustancialmente y la transmisión vectorial fue interrumpida en Uruguay en el año 1997, en Chile en el año 1999, y en la mayor parte de Brasil en 2000 (Salvatella et al., 2014). Sin embargo, la frecuencia de transmisión ha aumentado en regiones como la cuenca amazónica (transmisión oral) (Shikanai-Yasuda y Carvalho, 2012) y algunas áreas del Gran Chaco Boliviano (debido a la resistencia del vector a los piretroides) (Gurevitz et al., 2013).

Desde hace algunos años, la situación epidemiológica se complica con la entrada de inmigrantes procedentes de regiones endémicas a muchos países de Europa, el Pacífico occidental, Estados Unidos y Canadá, donde esta enfermedad se ha vuelto un problema de salud importante, al observarse un número creciente de individuos infectados (Pinto et al., 2014; Antinori et al., 2022; Gómez-Ochoa et al., 2022; Iglesias-Rodríguez et al., 2022; Navarro et al., 2022; Gonzalez-Sanz et al., 2023; Iglesias-Rus et al., 2023; Torres Martínez et al., 2023; Wirth et al., 2023; Llovera et al., 2024). EC ha cruzado las fronteras internacionales y ahora es una epidemia global, en la medida en que puede transmitirse a regiones no endémicas. La prevalencia combinada de la infección en los migrantes latinoamericanos que viven en Europa se estima en un 4,2% (IC del 95% 2,2-6,7), con la mayor prevalencia entre migrantes de Bolivia (18,1%) y Paraguay (5,5%) (Requena-Méndez et al., 2015; Navarro et al., 2022; Iglesias-Rus et al., 2023). En los Estados Unidos se estima 288.000 personas infectadas, incluidos 57.000 pacientes con cardiomiopatía chagásica y 43.000 mujeres en edad reproductiva infectadas (Irish et al., 2022).

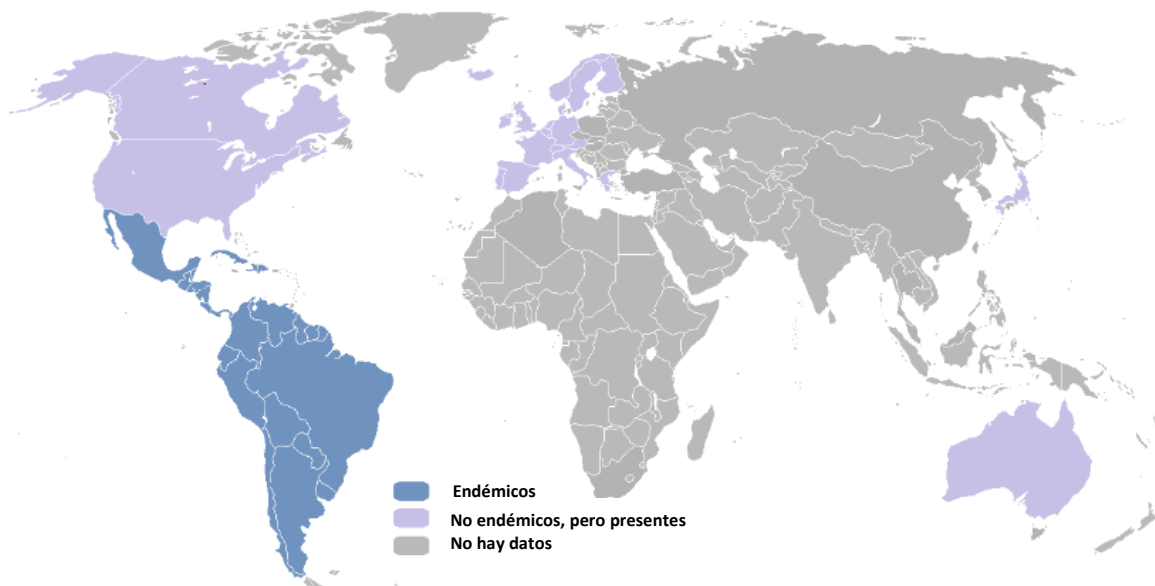


Figura 6. Distribución global que muestra los países endémicos para la enfermedad de Chagas, donde la transmisión ocurre principalmente por la acción de los insectos vectores, así como los países que reciben personas infectadas de estas regiones debido al proceso migratorio. Tomado de Sangenito et al., 2020.

3.7. Vectores de la Enfermedad de Chagas.

El ciclo de vida de *T. cruzi* requiere normalmente de dos hospederos: un insecto hematófago capaz de producir formas metacíclicas (hospedero invertebrado) y un mamífero (hospedero vertebrado). Los hospederos vertebrados lo constituyen los seres humanos y más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos y cobayos) y animales silvestres (roedores, marsupiales y armadillos) (Martín-Escolano et al., 2022).

El hospedero invertebrado lo constituyen insectos hematófagos pertenecientes al orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae, los que se infectan a través de la succión de sangre de mamíferos con tripomastigotes infectados dentro de tres ciclos que se solapan: doméstico, peridoméstico y silvestre y estos a su vez infectan al hospedero vertebrado a través de las heces eliminadas por el vector infectado en el momento de alimentarse (Brener, 1985).

La subfamilia Triatominae se compone actualmente de 151 especies descritas (149 existentes y dos fósiles), asignadas a cinco tribus (Justi y Galvão, 2017, Carbajal de la Fuente et al., 2022). Las dos tribus de Triatominae más estudiadas, Triatomini y Rhodniini, son comprensiblemente las más abundantes ("más fáciles de encontrar") y también las más diversas ("especies más descritas"). Ambas tribus se describieron como monofiléticas en base a la morfología, antes que los datos de secuencia de ADN estuvieran disponibles, sin embargo, los nuevos datos filogenéticos muestran que los géneros dentro de cada grupo no lo son (Justi y Galvão, 2017).

Aunque las especies de triatomas se han identificado y se consideran potencialmente capaces de transmitir el parásito, solo un grupo de ellas se ha demostrado como vectores de la enfermedad. La capacidad vectorial de una especie dada de *Triatoma* depende de su grado de asociación con los humanos. La mayoría de los triatomineos presentan hábitats silvestres, transmitiendo el parásito a los huéspedes asociados con el hábitat silvestre. Sin embargo, al menos 10 especies son consideradas poblaciones estrictamente domésticas principalmente en América Latina, mientras que al menos 20 especies son consideradas vectores secundarios al invadir las casas de los hábitats peridomésticos (Vallejo et al., 2009; Carbajal de la Fuente et al., 2022). Los principales vectores domésticos en los países endémicos son: *Triatoma infestans* (Fig. 7a), *Panstrongylus megistus* (Fig. 7b), *Rhodnius prolixus* (Fig. 7c) y *Triatoma dimidiata* (Fig. 7d) debido a que son aquellas especies que adquirieron hábitos domiciliarios (Otálora-Luna et al., 2015) y tendencias antropofílicas (Figura 7).

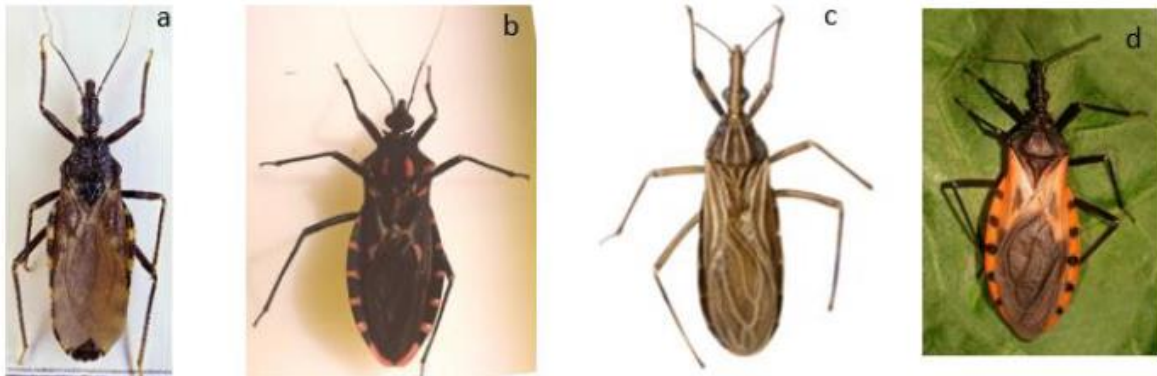


Figura 7. Principales especies de triatominos transmisores de Chagas al ser humano: a) *Triatoma infestans*, b) *Panstrongylus megistus*, c) *Rhodnius prolixus*, d) *Triatoma dimidiata*. (Carbajal de la Fuente et al., 2022).

3.8. Formas de transmisión.

Además de la principal vía de transmisión de *T. cruzi* que es la propagación vectorial (de Fuentes-Vicente et al., 2018), este parásito puede transmitirse a través de otras rutas entre las que se encuentran la sanguínea, congénita, trasplante de órganos, oral y accidentes de laboratorio. Estas tienen un papel importante en los países no endémicos y una importancia creciente en las áreas endémicas (Suárez et al., 2022).

La transmisión madre a hijo es actualmente el principal modo de transmisión de *T. cruzi* por encima de transfusiones de sangre y trasplantes de órganos en áreas libres de vectores dentro y fuera de América (Carlier et al., 2019; Echevarría et al., 2020). La OMS estima que 1125 000 mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi* en América Latina, con una incidencia de infección congénita de 8,668 casos/año (Carlier et al., 2019). Se estima que la tasa de transmisión de madre a hijo es del 4,7 % (rango 3,9-5,6 %) y que esta tasa podría ser mayor en

países endémicos que en países no endémicos (5 % vs 2,7 %) (Howard et al., 2014; Luquetti et al., 2015; Carlier et al., 2019; Chancey et al., 2023). El principal determinante biológico para la transmisión congénita es la parasitemia, que podría ser tan alta como 31 % cuando *T. cruzi* es detectable por PCR, aunque la transmisión también es posible cuando la PCR es negativa (Bua et al., 2012; Murcia et al., 2013). La infección congénita por *T. cruzi* es una infección aguda en recién nacidos que debe tratarse con terapia antiparasitaria. Si no se trata, la infección puede progresar a EC crónica más adelante en la vida, con una caída en la tasa de curación (Carlier et al., 2019).

Trypanosoma cruzi también puede ser transmitido a través de sangre y productos sanguíneos; esta constituye una causa frecuente de transmisión de la enfermedad después de la transmisión vectorial; la tasa de transmisión estimada por unidad de sangre infectada es del 10-25 % (Cancino-Faure et al., 2015; Suárez et al., 2022). Su riesgo radica en que puede extenderse más allá de las áreas endémicas, debido a la migración de latinoamericanos hacia países de Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía (Shikanai-Yasuda et al., 2022). Aunque se desconocen las cifras concretas, en los países europeos se estima que alrededor del 2 % de los inmigrantes latinos están infectados con *T. cruzi* y que podrían actuar como donadores de sangre (Montalvo-Ocototxtle et al., 2022; Murillo-Godínez et al., 2018). En Estados Unidos, se han documentado cinco casos de infección por *T. cruzi* asociados a transfusiones de sangre desde la década de los ochenta, y entre 2006 y 2011 se reportaron 1.459 donaciones seropositivas para *T. cruzi*. Con la tamización en bancos de sangre en Latinoamérica desde 1993, se ha disminuido la prevalencia de la infección por transfusiones (Suárez et al., 2022).

Los candidatos a trasplante y los donantes con infección crónica por *T. cruzi* tienen riesgo de reactivación de la enfermedad de Chagas y transmisión de la infección (La Hoz, 2022). Las tasas de infección después del trasplante de órganos sólidos de un donante infectado parecen ser más bajas para los receptores de riñón (0-19 %) (Riarte et al., 1999; Huprikar et al., 2013; Cicora et al., 2014) que para los receptores de hígado (0-29 %) (Chin-Hong et al., 2011; Huprikar et al., 2013) y los receptores de corazón (75-100 %) (Kun et al., 2009; Huprikar et al., 2013). Los receptores con infección crónica y los que reciben órganos de donantes infectados deben someterse a un seguimiento secuencial con PCR para la detección precoz de la reactivación y tratamiento preventivo con terapia tripanocida (La Hoz, 2022).

La infección oral después de un período de latencia de 3 a 22 días después de la ingestión se caracteriza por manifestaciones más graves que las asociadas con la transmisión vectorial: fiebre prolongada, miocarditis aguda con insuficiencia cardíaca y, en algunos casos, meningoencefalitis. La mortalidad puede alcanzar hasta el 33 % de los infectados (Filigheddu et al., 2017). Está asociada al consumo de carne de animales salvajes (que actúan como reservorios de la enfermedad) y zumos o jugos de fruta caseros o artesanales (jugo de caña de azúcar, el açaí, el jugo de açaí, el agua contaminada, el jugo de palmito y el jugo de guayaba). Las principales localidades afectadas han sido Brasil, Pará, Amapá y Amazonas, y otros países

latinoamericanos como Guayana Francesa y Venezuela (Pacheco et al., 2021). Se suele dar en forma de brote y tiene mayor morbimortalidad, ya que se adquiere mayor carga parasitaria. La principal especie transmisora por esta vía es *Panstrongylus geniculatus*, que no es buen transmisor vía vectorial porque no defeca a la vez que se alimenta (Vivas et al., 2021).

Otro modo de transmisión menos frecuente incluye accidentes de laboratorio (Herwaldt, 2001; Suárez et al., 2022).

3.9. Tratamiento

A nivel mundial, la enfermedad está sub-diagnosticada en gran medida (se estima que el 90 % de las personas afectadas no conocen de su infección y por lo tanto están en riesgo de transmitirla y sufrir complicaciones (Basile et al., 2011)) e infra-tratados (menos del 1 % de las personas afectadas tienen acceso al tratamiento (Ribeiro et al., 2009)).

El tratamiento con la droga antiparasitaria puede curar usualmente la infección aguda y prevenir las manifestaciones crónicas (50-80 % de los casos) (Pinto et al., 2009; Rassi et al., 2010).

Sólo dos fármacos, el benznidazol y el nifurtimox, están licenciados para el tratamiento de EC. Ambos han sido el pilar del tratamiento parasiticida por casi 50 años, aunque su perfil de seguridad y eficacia no es el ideal (referencia). Además, dado que la eficacia del tratamiento parece disminuir con el tiempo desde la infección primaria, la detección temprana e intervención son cruciales.

El tratamiento con fármacos anti-Tripanosómicos siempre se recomienda para EC aguda y congénita, las infecciones reactivadas y las enfermedades crónicas en niños menores de 18 años. Dado que la persistencia de la parasitosis y la inflamación crónica concomitante subyacen a la cardiomiopatía chagásica crónica, el tratamiento parasiticida se ofrece generalmente a los pacientes con EC crónica en la fase indeterminada y a los pacientes con enfermedad leve a moderada (Andrade et al., 2011). Sin embargo, las opiniones difieren sobre el impacto del tratamiento etiológico en esta fase crónica. Los resultados de una revisión sistemática y meta-análisis mostraron que el tratamiento con benznidazol tenía poco beneficio y que el efecto observado podría ser marginal comparado con placebo o sin tratamiento en la fase crónica (Pérez-Molina et al., 2009). En el estudio BENEFIT, el tratamiento con benznidazol reduce significativamente el deterioro clínico cardíaco en pacientes con cardiomiopatía de moderada a severa (Morillo et al., 2015). Por otro lado, el tratamiento de las mujeres en edad fértil ha demostrado ser eficaz para interrumpir la transmisión vertical (Fabbro et al., 2014). El tratamiento debe ser individualizado para pacientes mayores de 50 años y para pacientes con comorbilidades.

Nifurtimox fue el primer fármaco utilizado y se administra por vía oral en tres o cuatro dosis durante 60-90 días. Las tasas de cura en la fase crónica indeterminada oscilan de 86 % en niños menores de 14 años a 7-8 % en adultos (Streiger et al., 2004). La frecuencia de los efectos adversos por nifurtimox es 43,0-97,5 %; los más comunes son anorexia, pérdida de peso, trastornos neurológicos (irritabilidad, insomnio, desorientación, cambios de humor, parestesias y neuropatía periférica), manifestaciones digestivas, tales como náuseas y vómitos, y, ocasionalmente, fiebre y erupción cutánea. El tratamiento se interrumpe en 14,5-75,0 % de los casos (Jackson et al., 2010; Thakare et al., 2021).

Benznidazol es generalmente preferido sobre Nifurtimox debido a su mejor perfil de tolerabilidad, penetración de tejido, y posiblemente, la eficacia. Se administra oralmente en dos o tres dosis por lo general durante 60 días. Dosis más altas se recomiendan hasta 15 mg/kg en casos de meningoencefalitis. De acuerdo con algunos resultados, 30 días de tratamiento puede ser útil para los adultos infectados crónicamente (Viotti et al., 2006). El benznidazol tiene una actividad considerable durante las fases tempranas de la infección por *T. cruzi*: la curación serológica es alcanzado en hasta el 100 % de los pacientes con enfermedad congénita tratados durante el primer año de vida y en 76 % de los pacientes con enfermedad aguda (Cancado, 1999; Schijman et al., 2003). En la fase crónica, las tasas de curación son mucho más bajas: 60-93 % en niños de hasta 13 años y 2-40 % en adultos con enfermedad crónica tardía, aunque estos valores mejoran con un mejor seguimiento (Cancado, 1999; Fabbro et al., 2007). Los efectos adversos más comunes implican hipersensibilidad, principalmente en forma de erupción cutánea (29-50 %), intolerancia digestiva (5-15 %) y síntomas como anorexia, astenia, dolor de cabeza y trastornos del sueño (40 %), la neuropatía y la depresión de la médula ósea se consideran raras. El tratamiento es interrumpido en el 9-29 % de los casos, aunque estas reacciones son reversibles y severas en menos del 1 % de casos (Molina et al., 2015). Ni los niveles séricos elevados de fármacos ni dosis diarias (> 300 mg) se han asociado con un aumento de la frecuencia de eventos adversos (Pinazo et al., 2013).

Desde la introducción de benznidazol y nifurtimox, sólo el alopurinol y los triazoles (inhibidores de la biosíntesis del ergosterol) se han estudiado en ensayos clínicos, estudios observacionales y reportes de casos (referencia).

La monoterapia con ravuconazol o posaconazol ha demostrado ser eficaz para el tratamiento de la infección crónica por *T. cruzi* (Molina et al., 2014) y la combinación de posaconazol y benznidazol no proporciona más ventajas sobre la eficacia o la seguridad de la monoterapia con benznidazol. La evidencia reciente sugiere que los actuales regímenes de benznidazol pueden ser optimizados con esquemas de dosis intermitentes, esquemas de reducción de dosis o terapias combinadas (Bustamante et al., 2013; Garcia-Huertas y Cardona-Castro, 2021).

Para el desarrollo de nuevos fármacos y la estandarización de los ensayos clínicos se necesita de modelos de animales más efectivos (Francisco et al., 2015). Actualmente se cuenta con

modelos animales que presentan un valor predictivo limitado lo que explican los fracasos clínicos observados con nuevos triazoles (Francisco et al., 2015).

Por otro lado, varias instituciones y grupos de investigaciones han trabajado en algunas estrategias que pueden ayudar a abordar el problema. Algunos de estos incluyen la modificación de las dosis de medicamentos convencionales, la reutilización de medicamentos y la terapia combinada. También se han estudiado plantas y compuestos derivados con efectos antiparasitarios, aprovechando los conocimientos de la medicina tradicional. Otros han estudiado el parásito para identificar genes esenciales que pueden usarse como objetivos terapéuticos de nuevos fármacos. Algunos de estos estudios han generado resultados prometedores, pero pocos llegan a estudios de fase clínica.

Aunque los gobiernos y la industria farmacéutica han mostrado poco interés en contribuir a esta solución, se precisa identificar nuevas alternativas terapéuticas seguras y efectivas para tratar la enfermedad de Chagas. Se debe alentar a unificar esfuerzos y cubrir todos los aspectos del desarrollo de medicamentos de acuerdo con la disponibilidad de recursos y conocimientos que permita el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para tratar la enfermedad de Chagas y beneficiar a las poblaciones a las que afecta (García-Huertas y Cardona-Castro, 2021).

3.10. Epidemiología molecular de *T. cruzi*.

Se sabe que *T. cruzi* tiene una población heterogénea con una diversidad genética actualmente clasificada en UDT, denominadas TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y TcBat (Marcili et al. 2009; Zingales et al., 2009, 2012; Zingales y Macedo, 2023). Las relaciones evolutivas entre las UDT se entienden parcialmente y, según el número y la naturaleza de los genes analizados, las relaciones entre los mismos cambian, de ahí que se plantee que las relaciones evolutivas entre los UDT no han sido completamente dilucidadas. Todos los enfoques coinciden en que TcI y TcII permanecen como dos líneas puras que evolucionaron separadamente a partir de un ancestro común que data de aproximadamente 1-3 millones de años. Los linajes TcV y TcVI claramente tienen un origen híbrido con TcII y TcIII como progenitores imputados y los linajes TcIII y TcIV podrían también haberse originado a partir de un híbrido entre TcI y TcII, pero algunos autores no están de acuerdo con estos resultados de ahí que la evolución de estos linajes ha sido un tema de intenso debate. Las relaciones evolutivas entre las diferentes UDT y por consiguiente la historia evolutiva de *T. cruzi* continúa bajo investigación (Brenière et al., 2016).

TcI tiene una amplia distribución geográfica en todo el continente americano prevaleciendo en México, América Central, la región andina y Amazonía (Guhl et al., 2014; Ramírez et al., 2014). Existen diferentes especies de mamíferos (por ejemplo: zarigüeyas, roedores, primates y osos hormigueros) y especies de triatomíneos (por ejemplo: *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835), *Triatoma brasiliensis* (Neiva, 1911), *Triatoma pseudomaculata* (Correa y Espinola, 1964),

Rhodnius nasutus (Stal, 1859) y *Rhodnius pictipes* (Stal, 1872), que están involucrados en el ciclo selvático (Zingales et al. 2012; Zingales 2018; Zingales y Macedo, 2023). También se ha aislado de perros domésticos (*Canis lupus familiaris*) evidenciando así su presencia en ambos ciclos (Bezerra et al., 2014). Estudios muestran que las manifestaciones clínicas que predominan en esta UDT son las formas indeterminadas o cardíacas (Breniere et al., 2016; Izeta-Alberdi et al., 2016; Zingales, 2018)

Por el contrario, TcII se encuentra predominantemente en las regiones del sur y centro de América del Sur, principalmente en el centro y sudeste de Brasil (Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023). Esta UDT se ha detectado especialmente en murciélagos, primates, roedores, marsupiales, pizotes (Jansen et al. 2015, 2018); y vectores triatomíneos (Lilioso et al., 2017; Darío et al., 2018). Este se ha identificado con mayor frecuencia en ciclos domésticos que en ciclos selváticos. Los individuos diagnosticados con que TcII presentan una amplia gama de enfermedades cardíacas y/o patologías digestivas (Breniere et al., 2016; Izeta-Alberdi et al., 2016; Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023)

TcIII se distribuye geográficamente desde el noreste de Venezuela a Argentina. Esta UDT es comúnmente encontrada en ecotopos terrestres y fosoriales en armadillos de los géneros *Dasybus*, *Chaetophractus* y *Euphractus* actuando como reservorios principales (Zingales et al., 2012; Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023), pero también se pueden encontrar en marsupiales (ejemplo: *Didelphis* spp., *Monodelphis* spp.), roedores (ejemplo: *Galea spixii*) y humanos (Abolis et al. 2011; Zingales et al., 2012; Martins et al., 2015). Se asocia principalmente con el ambiente selvático (Zingales, 2018). En cambio, TcIV es reportado en el Norte y sur América. Los principales reservorios para esta UDT en América del Sur son primates salvajes y pizotes (*Nasuanasua*), siendo los mapaches importantes reservorios en América del Norte (Zingales, 2018). Del mismo modo que TcIII es mayormente relacionado con el ciclo selvático (Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023).

TcV es la UDT más común en Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay (Guhl et al., 2014; Ramírez et al., 2014). En Brasil, TcVI ha sido aislado en *T. brasiliensis* (Lima-Oliveira et al., 2020). Esta UDT se encuentra en alrededor del 50 % de los pacientes en Argentina, que también están infectados con TcVI (Guhl et al., 2014; Ramírez et al., 2014). Las infecciones humanas por TcIV son raras, sin embargo, esta UDT es la causa secundaria de EC en Venezuela y reportado en transmisión oral de brotes en la Amazonía brasileña. Ambas son raras en el ciclo salvaje y los datos sobre su rango de hospederos es escaso. De hecho, se han publicado algunos reportes en huéspedes mamíferos de los géneros *Dasybus*, *Euphractus* y *Octodon* (Zingales et al., 2012). Las afectaciones más comunes provocadas por TcV varían desde una amplia gama de enfermedades cardíacas y/o patologías digestivas (Breniere et al., 2016; Izeta-Alberdi et al., 2016; Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023)

Por último, TcBat se ha detectado en murciélagos en Brasil, Panamá y Colombia (Zingales, 2018). Se ha podido aislar en *Mpoyotis* spp., *Noctilio* spp., *Triatoma sordida* (Stål, 1859) (Cominetti et al., 2014) y los casos reportados en humanos datan de un informe de ADN TcBat en momias y en un niño de Colombia (Guhl et al., 2014; Ramírez et al., 2014).

Con esta y otra información, se podría trazar una línea hipotética en el mapa de la Figura. 8 separando las manifestaciones cardíacas y cardíacas + digestivas. Esta representación indica que la manifestación digestiva está ausente (o son muy raras) en México, Centro y norte de Sudamérica en comparación con otros países de América del Sur (Zingales y Bartholomeu, 2022).

Como consecuencia de las diferencias genotípicas y fenotípicas de las cepas de *T. cruzi* y la distribución geográfica diferencial de las UDT en humanos, si se verificaron variaciones regionales en la sensibilidad de las pruebas serológicas. La resistencia natural al benznidazol y al nifurtimox, verificada *in vivo* e *in vitro* para algunos aislamientos de parásitos, no está asociada con ninguna UDT en particular, y no explica la diferencia marcada en la eficacia antiparasitaria de ambos fármacos en las fases aguda y crónica de la EC (Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023).

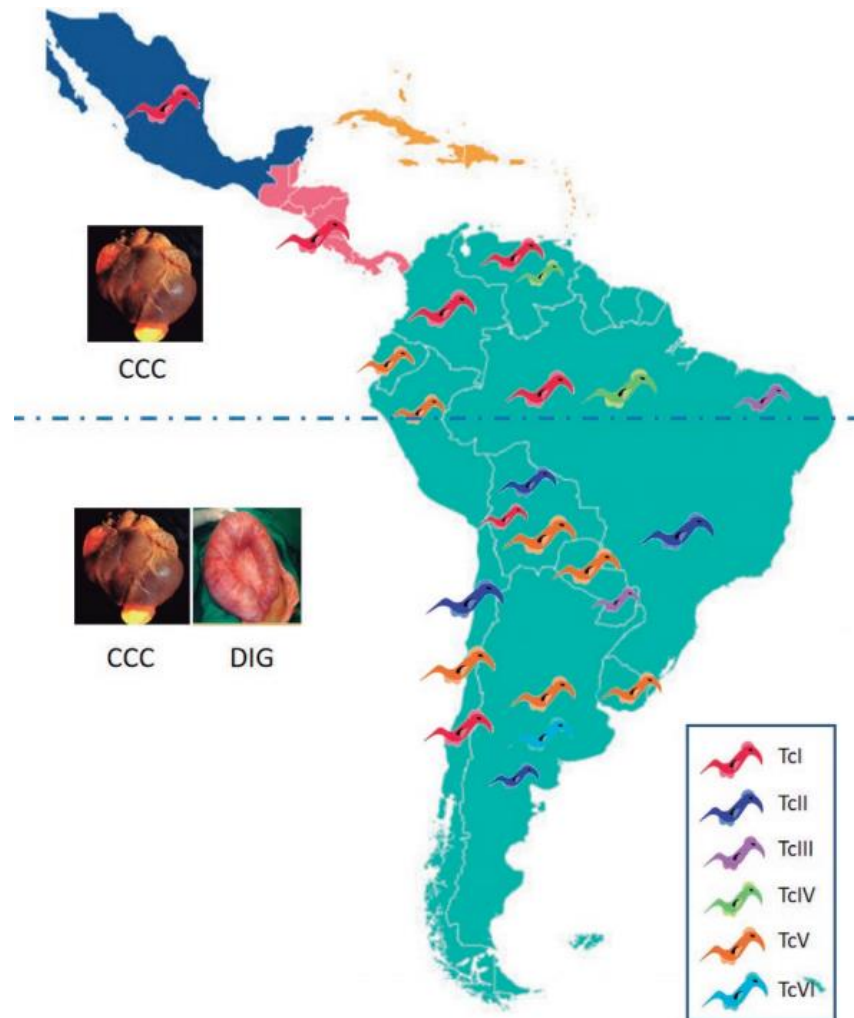


Figura 8. El mapa muestra la distribución de las unidades discretas de tipificación (UDT) de *Trypanosoma cruzi* humano en México y países de América Central y del Sur. Los tamaños de los dibujos de parásitos reflejan la presencia relativa de las UDT en un área determinada (cuanto más grandes, más prevalentes). La línea discontinua separa las regiones geográficas según la patología prevalente de la enfermedad de Chagas crónica: cardiomiopatía chagásica crónica (CCC) y forma digestiva (DIG). Tomado de Zingales y Bartholomeu, 2022.

El amplio debate existente sobre el tema hace necesario continuar los estudios de detección de UDT en las muestras clínicas, vectores y reservorios de países endémicos y no-endémicos de la enfermedad y correlacionar los mismos con las manifestaciones clínicas, la susceptibilidad a los métodos de diagnóstico utilizados y la sensibilidad a los antiparasitarios. Pero para ello es importante contar con métodos moleculares más simples y/o estrategias más sencilla y reproducible para la identificación de los linajes del parásito, que estén disponibles para su uso generalizado en áreas endémicas, manejable en cualquier laboratorio y puedan aplicarse directamente a las muestras clínicas y biológicas.

Diferentes métodos moleculares han permitido la detección y diferenciación de las UDT de *T. cruzi* directamente a partir de las muestras clínicas, vectores y reservorios (Cura y Shijman, 2013); en los que se incluyen los métodos de PCR (Souto y Zingales, 1993; Clark y Pung, 1994; Souto et al., 1996; Burgos et al., 2007), la PCR anidada (Bontempi et al., 2016), la PCR- RFLP (Westenberger et al., 2005; Freitas et al., 2006; Rozas et al., 2007; Zingales et al., 2012) y más recientemente la técnica de PCR en tiempo real (Cura et al., 2015; Muñoz-San Martín et al., 2017; Zulantay et al., 2022) y la misma acoplado al análisis de alta resolución de fusión (HRM siglas del inglés High Resolution Melting) (Freitas et al., 2005; Higuera et al., 2013).

De la misma forma diferentes blancos genéticos han sido utilizado en los métodos moleculares antes mencionados como son: mini-exon (Burgos et al., 2007), regiones intergénicas para minixon (SL-IR) (Burgos et al., 2007), subunidad grande ARN ribosomal24S (Souto y Zingales, 1993; Souto et al., 1996), subunidad pequeña del ARNribosomal18S (Clark y Pung, 1994), fragmento nuclear A10 (A10) (Burgos et al., 2007), el citocromo oxidasa subunidad II (COII) (de Freitas et al., 2006), Proteína de unión a GTP similar a Rho (RHO1), 3-Hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMCOAR), Glucosa-6-fosfato isomerasa (GPI), peroxidasa mitocondrial (TcMPX) (Diosque et al., 2014) y los minicírculos del ADN del kinetoplasto (Bontempi et al., 2016).

De forma general se utilizan flujogramas o esquemas de tipificación de secuencias multilocus que combinan un método molecular con diferentes blancos genéticos o juegos de cebadores o tres o más métodos moleculares diferentes, con diferentes blancos genéticos; de los antes mencionados. Con estos se llega a determinar el linaje del parásito a partir de aislamientos o directamente a partir de las muestras clínicas de pacientes, vectores y reservorios (D'Ávila et al., 2009; Lewis et al., 2009; Burgos et al., 2010; Diosque et al., 2014; Lima et al., 2014; Cura et al., 2015; Joselin et al., 2021; Silva et al., 2021; Murillo Solano et al., 2021; Torhorst et al., 2022; Sánchez et al., 2022; Zulantay et al., 2022). Sin embargo, hasta el momento ningún blanco genético único permite la resolución completa de las UDT. De ahí la necesidad de buscar alternativas de detección más sencillas.

Un marcador evolutivo prometedor, la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70), se ha demostrado que es útil para el análisis filogenético de varios parásitos como *Cryptosporidium* spp. (Langkjaer et al., 2007; Sulaiman et al., 2000), *Babesia* spp. (Yamasaki et al., 2002, 2007), *Giardia* spp. (Arisue et al., 2002b), *Entamoeba* spp. (Arisue et al., 2002), *Microsporidium* spp. (Arisue et al., 2002), *Blastocystis hominis* (Arisue et al., 2002a), los géneros *Leishmania* (Fraga et al., 2010, 2013, 2021; Castillo-Castañeda et al., 2022) y *Trypanosoma* (Fraga et al., 2016, 2021; Castillo-Castañeda et al., 2022). Las proteínas HSP70 están altamente conservadas en procariontes y eucariontes tanto en secuencia como en función, y tienen gran importancia como chaperonas moleculares y en el plegamiento y transporte de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Son una subfamilia de la familia HSP70 (Folgueira y Requena, 2007), que desempeña un papel importante en las adaptaciones ambientales de los *Trypanosomas*. Los genes de la

subfamilia *hsp70* están dispuestos como una matriz de repetición en tándem de forma de cabeza a cola, de los cuales en *T. cruzi* están presentes al menos siete copias (Requena et al., 1988). Este gen ha sido utilizado para la detección e identificación de especies de *Leishmania* en el Viejo y Nuevo Mundo usando la PCR, seguido por análisis del RFLP, que muestran alta sensibilidad y especificidad en las muestras clínicas (García et al. 2007; Fraga et al., 2012; Montalvo et al., 2012, 2014, 2017; Veland et al., 2012). De la misma forma este gen se ha utilizado para la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*, mediante una PCR dúplex, mostrando una alta sensibilidad y especificidad (Fraga et al., 2014). El análisis filogenético dentro de los aislamientos de *T. cruzi*, basados en este gen, muestran cuatro grupos genéticos, correspondiente a las UDT: TcI, TcIII, TcIV y los UDTs TcII, TcV y TcVI que no forman entidades separadas, este gen se encuentra bajo una selección purificadora que le permite su conservación y preservar la funcionalidad de la proteína, sin embargo, se observan sitios parsimoniosamente informativos que lo hace un marcador molecular apropiado para diseñar métodos moleculares para la detección e identificación de las UDT de *T. cruzi* (Fraga et al., 2016; 2021). Recientemente la técnica diseñada y evaluada analíticamente se utilizó para identificar las UDTs de 55 muestras clínicas de pacientes, vectores y reservorios de diferentes orígenes geográficos mostrando un porcentaje de tipificación de alrededor de 50 % de forma general, y mejor cuando se estudian vectores.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el período de tiempo comprendido entre septiembre de 2023 y julio de 2024, en el laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK.

4.2. Universo de trabajo

El universo de trabajo estuvo integrado por ADN procedente de cepas de *T. cruzi* caracterizadas como referencia y ADN procedente de las muestras clínicas de pacientes, las cuales se detallan a continuación.

4.2.1 Cepas de referencia de *Trypanosoma spp.*

Se utilizaron como cepas de referencia las muestras de ADN de seis cepas de *T. cruzi* correspondientes a los diferentes linajes del parásito procedentes de distintos orígenes geográficos (Tabla 1). La clasificación de especies y los linajes de *T. cruzi* se realizó de acuerdo a los métodos de análisis múltiple de enzimas mediante electroforesis (MLEE, siglas del inglés *Multilocus enzyme electrophoresis*), la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD, siglas del inglés *Random Amplified Polymorphic DNA*), así como la PCR-miniexon determinados en los laboratorios de los países de origen (Bosseno et al., 1996; Brenière et al., 1997; 1998; Bernabé et al., 2000).

Tabla 1. Cepas de referencia de *Trypanosoma spp.* que se utilizaron en el estudio.

Especie	Nombre de la Cepa	País	Genotipo
<i>Trypanosoma cruzi</i>	SP104	Chile	I
	MAS	Brasil	II
	M5631	Brasil	III
	92122102R	USA	IV
	SO3	Bolivia	V
	CL Brener	Brasil	VI

4.2.2. Muestras clínicas

Se utilizaron como parte de la evaluación de la técnica, ADN extraído a partir de 193 muestras clínicas que se encuentra conservado en el banco de ADN del Laboratorio de Parasitología

Molecular del IPK y que fueron obtenidos previo consentimiento informado de los pacientes para la realización de estudios serológicos y moleculares, el resto de los ADN de las muestras clínicas utilizadas en el estudio fueron donadas por el laboratorio de Medicina Transfusional de la Universidad Autónoma de Morelos, México y el Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas Universidad de Antioquia, Colombia. Todas las muestras procedieron de pacientes con EC crónica confirmada a partir de la positividad a dos métodos serológicos de principio diferente determinados en cada laboratorio y el método de PCR kDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014): 30 pacientes de Bolivia, 2 de Argentina y 1 paciente de Belice, que forman parte del Banco de ADN del Laboratorio de Parasitología Molecular del IPK; 50 pacientes de Colombia, cuyos ADN fueron donados por el Grupo de Biología y Control de Enfermedades Infecciosas Universidad de Antioquia, Colombia, y 110 pacientes de México, cuyos ADN fueron donados por el Laboratorio de Medicina Transfusional de la Universidad Autónoma de Morelos, México. De cada uno de los pacientes está recogido en base de datos el país de procedencia y la presentación clínica de la Enfermedad (Indeterminada, Cardíaca o Digestiva).

4.3. Identificación de las UDT de *T. cruzi* mediante la RCP-RFLP *hsp70* DTU

En este estudio se utilizaron los cebadores sintéticos específicos *hsp70* DTU-F y *hsp70* DTUR (Tabla 2), que amplifican una región de 545 pb del gen que codifica la HSP70 de *T. cruzi* y que fueron diseñados previamente basados en el análisis de secuencias de especies de *Trypanosoma* (Fraga et al., 2016).

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar la región específica del gen *hsp70* citoplasmático de *T. cruzi*.

Cebador	Secuencia (5'- 3')
<i>hsp70</i> DTU-F	GCCAGATCTTCTCGACGTACGCG
<i>hsp70</i> DTU-R	GATGGGCGTGACAGGTTCTCC

La mezcla de reacción (50 µL) estuvo conformada por: solución amortiguadora coloreado de la PCR 1x (CoralLoad PCR buffer, en inglés) con 1,5 mM de MgCl₂, 1 mM adicional de MgCl₂, solución amortiguadora Q 1x, 200 µM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs), 1 U de HotStar Taq Plus ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania), 1,6 µM de cada cebador (Tabla 2) (CIGB, La Habana, Cuba) y 5 µL de ADN genómico (acápite 3.2). Se incluirán 2 controles negativos, uno constituido por el control de extracción de ADN y el otro tiene todos los componentes de la PCR excepto el ADN, y 6 controles positivos que contenían 10 fg de ADN molde a amplificar correspondientes a las 6 UDT de *T. cruzi* (Tabla 1); ADN que se encuentran en la colección de la Unidad de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica y los mismos fueron donados al IPK).

Los parámetros en el termociclador fueron: desnaturalización inicial a 95 °C 5 min; seguido de 35 ciclos correspondientes con desnaturalización 94 °C 40 seg – hibridación 65 °C 1 min – extensión 72 °C 1 min; y una extensión final a 72 °C por 10 min. Los amplicones resultantes se analizaron mediante gel de agarosa a 2 % en solución amortiguadora tris borato EDTA (TBE 0,5 x) (tris-borato 0,045 M; EDTA 0,001 M) que contuvo bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y se pudo visualizar mediante el sistema compacto de imágenes U: Genius (Syngene, Reino Unido). Se utilizó en la electroforesis el marcador de peso molecular *Gene™ Ruler 100bp DNA ladder* (MBI, Fermentas, Alemania).

A partir de los amplicones de la PCR *hsp70* UDT obtenidos se realizó el análisis de RFLP. Las digestiones se realizaron en un total de 10 µL que contuvo 5 µL de producto de PCR en tampón óptimo 1x proporcionado por el fabricante, 1U *Agel* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania), 5U *Hinfl* (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania) o 1 µL *HaeII* Fast digest (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Para las digestiones dobles con las enzimas *Agel* y *Hinfl*, se usaron 1U y 5 U, respectivamente en el tampón O, ya que la actividad de *Hinfl* en este tampón es solo del 50 %. Las reacciones se incubaron por 3 horas a 37°C, a excepción de *HaeII* (10 min). Posteriormente, los patrones de restricción se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa de pequeños fragmentos al 3 % (Gentaur, Bruselas, Bélgica), que funciona a 3,5 V / cm durante 3 h. Se utilizó el marcador de peso molecular ADN GeneRuler™ de 100 pb (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Se compararon los patrones obtenidos en las muestras analizadas con lo descrito en la Figura 9.

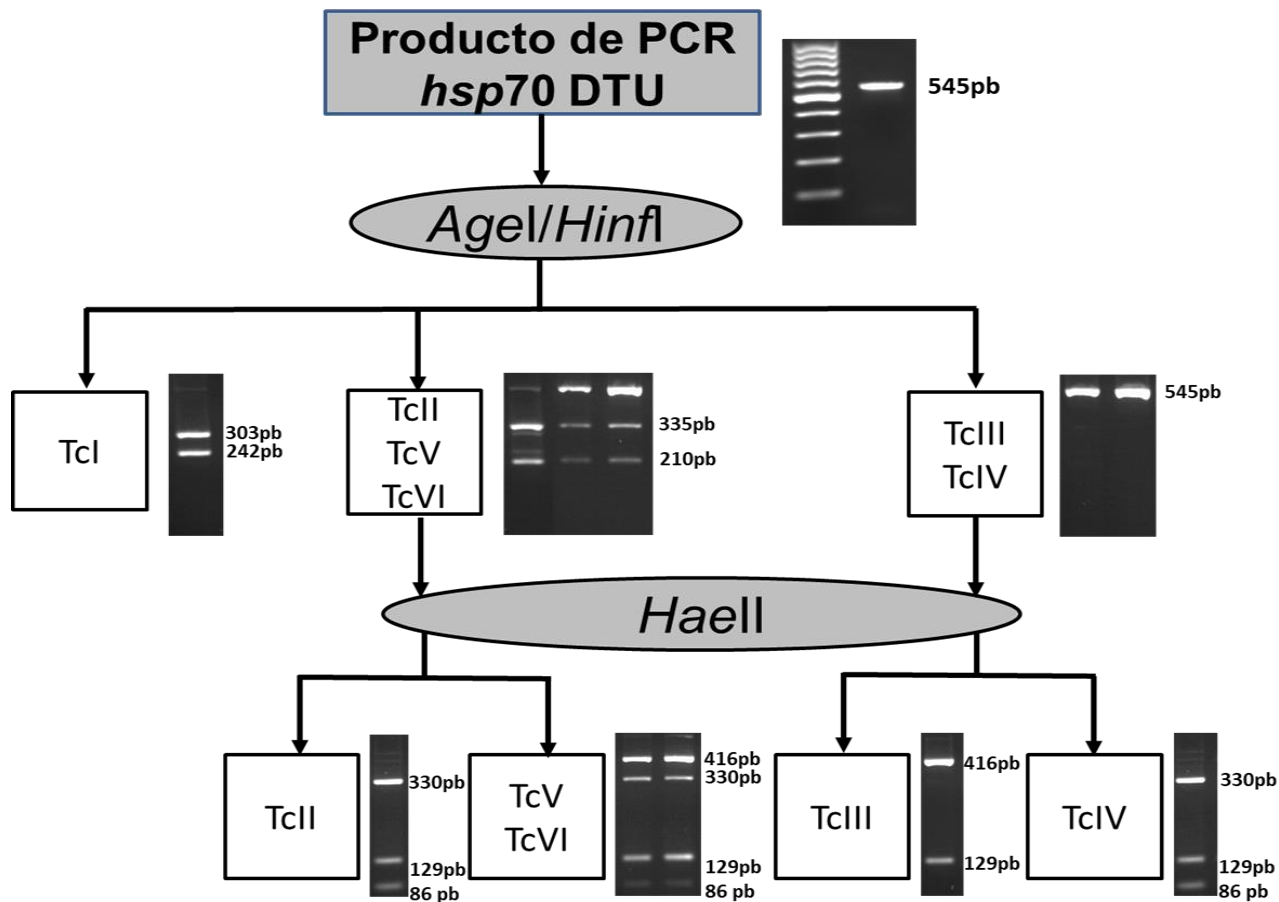


Figura 9. Patrones de digestión obtenidos al digerir los productos de PCR *hsp70* UDT con las enzimas de restricción *Agel/Hinfl* y *Haell*. En los recuadros las cepas de referencia evaluadas. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100 bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

4.4. Determinación del porcentaje de tipificación de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* DTU en las muestras clínicas.

Se reportó el porcentaje de tipificación (muestras tipificadas/muestras totales x100) para las muestras clínicas evaluadas, así como se expresó el porcentaje global de la técnica evaluada.

4.5. Operacionalización de las variables

A continuación, se describe la operacionalización de las variables que se usaron en el estudio (Tabla 3).

Tabla 3. Operacionalización de las variables cualitativas y cuantitativas que se usaron en el estudio

Nombre de la variable	Naturaleza de la variable	Operacionalización	Mediciones
UDT	cualitativa nominal politómica	TcI TcII TcIII TcIV TcV TcVI	números absolutos, porcentajes
Origen geográfico	cualitativa nominal politómica	Argentina Belice Bolivia Brasil Chile Colombia México USA	números absolutos, porcentajes
Presentación Clínica	cualitativa nominal politómica	Cardiaca Digestiva Indeterminada	números absolutos, porcentajes

4.6. Asociación de las UDT detectadas con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad

Se reportó la frecuencia de UDT encontrado en función del origen geográfico (país de procedencia) y la presentación clínica de la enfermedad (cardiaca, digestiva, indeterminada). Las frecuencias se expresaron como porcentajes para variables cualitativas. Se utilizaron pruebas estadísticas (pruebas t de Student, Chi-cuadrado, prueba exacta de Fisher, regresión logística) cuando sea apropiado. Se calcularon los intervalos de confianza del 95% (IC) y los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron significativos.

4.7. Consideraciones éticas

Esta investigación constituye una de las tareas del Proyecto " **Aportes a la identificación de los linajes de T. cruzi y a los estudios de epidemiología molecular de la Enfermedad de**

Chagas”. El proyecto fue evaluado y aprobado para su ejecución por el Comité de Ética Institucional del IPK (Proyecto de Investigación CEI-IPK-010-20).

Las muestras clínicas de pacientes utilizados en el estudio fueron obtenidas del citado proyecto, de las que se utilizará el ADN extraído como se explicó en el acápite correspondiente.

En el citado proyecto están descritas las consideraciones éticas que se tuvieron en cuenta: Los individuos participantes en la investigación solo sintieron una leve incomodidad durante la toma de la muestra de sangre periférica, sin embargo, en términos de beneficios, los individuos obtuvieron un diagnóstico sobre EC, seguido de asistencia médica y tratamiento adecuado, para aquellos que resultaron enfermos.

En la investigación participaron todos los estudiantes de medicina procedentes de países endémicos de la enfermedad que comenzaron sus estudios en la ELAM y colaboradores cubanos en áreas endémicas que regresaron a Cuba, que ofrecieron su consentimiento informado para participar, ambos durante los años 2023 y 2024. Los criterios de exclusión fueron aquellos que no desearan participar en la investigación.

Todo el personal involucrado en la investigación contó con la preparación y conocimientos necesarios para llevar a cabo todas sus funciones.

Para ninguno de los individuos involucrados en el estudio se procedió a retirar o aplazar terapias estándares por el propósito de la investigación. No estar de acuerdo en participar en esta investigación, no privó a los participantes de contar con el resultado a través del algoritmo diagnóstico que hoy se tiene establecido por el Programa de Control Sanitario Internacional del MINSAP.

Los pacientes confirmados de tener EC mediante los métodos serológicos y moleculares fueron tratados siguiendo los criterios establecidos por la OMS y las políticas del MINSAP, Cuba. Se utilizó benzonidazol 8 mg/kg/día, 3 veces al día, durante 60 días, indicado por médicos especialistas del IPK con supervisión del personal médico de atención de la ELAM. Los pacientes procedentes de otros países fueron tratados siguiendo las recomendaciones diagnósticas de cada país.

Así mismo, se aseguró la confidencialidad y seguridad de la información y los resultados. Sólo tuvieron acceso a los datos personales de los participantes de la investigación, el personal previamente autorizado por el DrC. Jorge Fraga, jefe del proyecto y tutor de la tesis tomándose todas las medidas para asegurar la confidencialidad y seguridad de la información personal de cada paciente:

- Cada individuo tuvo un código y de esta manera fue manipulado en toda la investigación.

- El personal encargado del procesamiento de los datos no reveló en caso alguna directa, ni indirectamente los hechos, datos o informaciones que se obtuvieron.
- Los sistemas de informatización tuvieron incorporadas las medidas de seguridad necesarias que evitaron la pérdida de los datos, la alteración de los mismos y que otras personas, no autorizadas, accedieran a los datos de los individuos.

Para tomar el consentimiento informado de cada individuo participante, en la ELAM e IPK según el grupo de individuos se le ofreció participar en el estudio por parte del médico de asistencia en ambas instituciones a partir del documento de consentimiento informado preparado. Una vez firmado el mismo se procedió a la toma de la muestra para los efectos de la investigación.

5. RESULTADOS

5.1. Características de los pacientes estudiados

Todos los pacientes (n=193) fueron diagnosticados mediante dos pruebas serológicas positivas de principio diferente determinados en cada laboratorio y el método de PCR kDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex hsp70 TcTr (Fraga et al., 2014) para *T. cruzi* (Tabla 4). De los 193 pacientes estudiados, 95 corresponden al sexo masculino que representan un 49.2% y 98 al sexo fue femenino representando un 50.8%. La edad media fue $47,2 \pm 11,7$ años (rango, 18-81 años). Los pacientes fueron clasificados según la forma clínica de la enfermedad, todos con enfermedad crónica. La forma clínica de la enfermedad que predominó fue la asintomática (indeterminada) con 105 pacientes (54.4%) con esta condición, le siguió las manifestaciones cardiacas en 69 pacientes (35.8%) y las manifestaciones digestivas en 19 (9.8%). El origen geográfico de los pacientes estudiados fue heterogéneo, 110 muestras provenían de México, 50 de Colombia, 30 de Bolivia, 2 de Argentina y 1 de Belice (Tabla 4). De las 193 muestras de pacientes evaluadas, sólo 94 resultaron positivas después de la amplificación del gen *hsp70* de *T. cruzi* utilizando la PCR-RFLP *hsp70* UDT.

Tabla 4: Características de los pacientes estudiados.

		No de pacientes	Por ciento (%)
Sexo	Hombres	95	49.2
	Mujeres	98	50.8
Edad		47.2 años (rango 18-81 años)	
Formas clínicas	Cardiaca	69	35.8
	Digestiva	19	9.8
	Asintomático (indeterminada)	105	54.4
Origen geográfico	México	110	57.0
	Colombia	50	26.0
	Bolivia	30	15.5
	Argentina	2	1.0
	Belice	1	0.5

5.2. Identificación de las UDT mediante la técnica PCR-RFLP *hsp70* UDT en las muestras clínicas de pacientes con EC.

De las 193 muestras clínicas analizadas procedentes de Argentina, Colombia, Bolivia, Belice y México, de pacientes con Enfermedad de Chagas Crónico indeterminado confirmado a partir de la positividad a dos métodos serológicos de principio diferente determinados en cada laboratorio y el método de la PCR kDNA (121-122) (Sturm et al., 1989) y la PCR dúplex *hsp70* TcTr (Fraga et al., 2014), se amplificaron mediante la PCR *hsp70* UDT, 93 muestras clínicas correspondiente a 20 muestras procedentes de Colombia, 19 procedentes de Bolivia, 1 muestra de Belice, 53 muestras procedentes de México y 1 muestra de Argentina. En la Figura 10 se muestra los resultados de la PCR-RFLP *hsp70* de 47 de las 193 muestras analizadas.

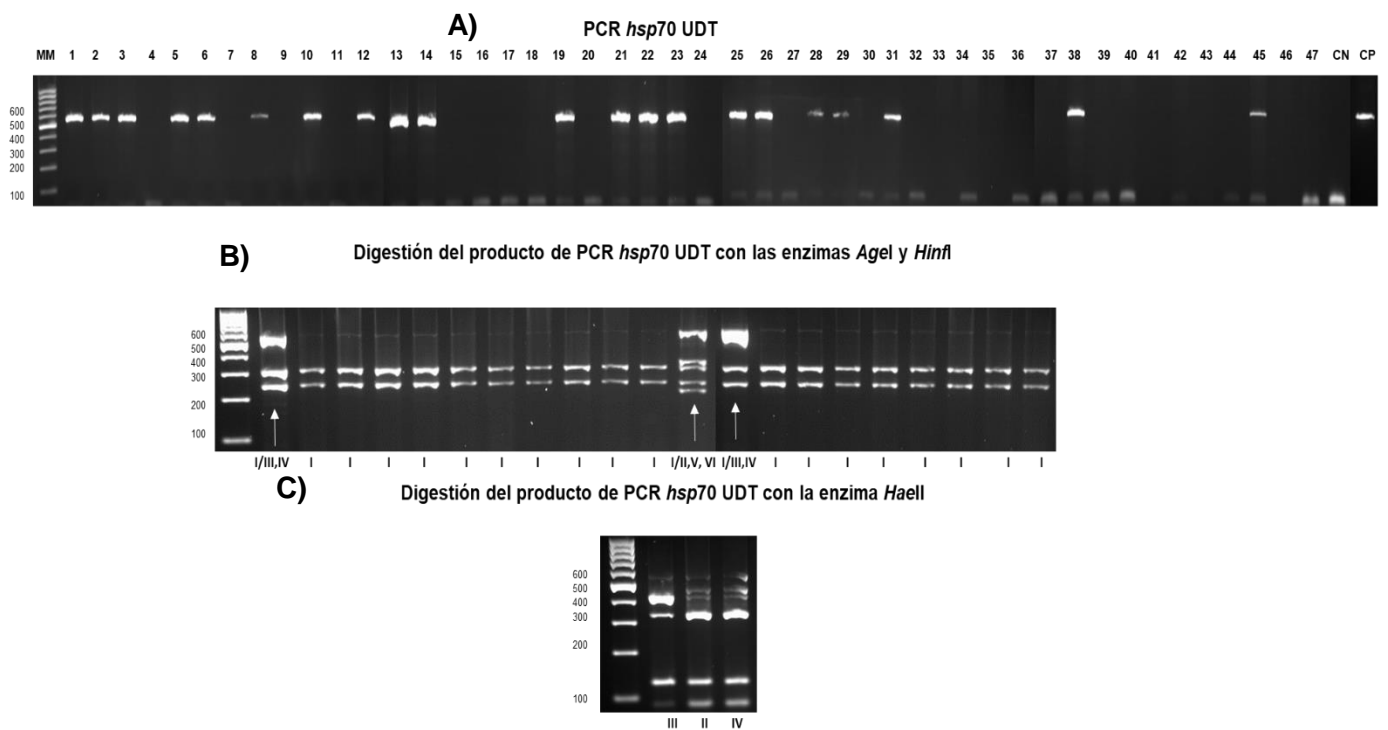


Figura 10. Patrón electroforético de la PCR-RFLP *hsp70* UDT obtenido de ADN procedente de muestras clínicas de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico de Argentina, Colombia, Bolivia, Belice y México. A) PCR *hsp70* UDT. B) RFLP del producto de PCR de 545pb con las enzimas de restricción *Agel* y *HinfI*. C) RFLP del producto de PCR de 545pb con la enzima de restricción *HaeIII*. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular GeneTMRuler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Carril 1 al 47: Muestras clínicas procedentes de Argentina, Colombia, Bolivia, Belice y México. CN: Control negativo. Debajo de cada gel en número romano el linaje correspondiente según la digestión.

Como resultado final se obtuvieron 63 de muestras clínicas de pacientes correspondan a TcI, de los linajes TcII y TcIV 4 muestras de cada una, 2 muestras clínicas correspondieron con TcIII y 16 con los linajes TcV o TcVI, representando un 94,6% (88 de las 94 muestras amplificadas) correspondieron a infecciones simples. Se detectaron utilizando la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT infecciones mixtas en 5 de las 94 muestras amplificadas, representando un 5,4%. Las cinco muestras clínicas que presentaron infecciones mixtas, 3 correspondieron a los linajes TcI+TcII, una muestra clínica correspondió a TcI+TcIV y otra a TcI+TcV o TcVI (Tabla 5).

Tabla 5. Distribución de UDT detectadas en muestras clínicas de pacientes procedentes de México, Colombia, Bolivia, Argentina y Belice.

Muestras clínicas	PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT	UDT							
		No de muestras (%)							
		TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV o VI	TcI/II	TcI/IV	TcI/IV o VI
193	94	63 (67.0%)	4 (4.2%)	2 (2.1%)	4 (4.2%)	16 (17.0%)	3 (3.2%)	1 (1.1%)	1 (1.1%)

5.3. Determinación del porcentaje de tipificación de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT.

De forma general el ensayo de PCR-RFLP *hsp70* UDT permitió tipificar el 48,7% de las muestras clínicas analizadas. En función del origen geográfico el porcentaje de tipificación vario entre un 40 a un 100% de tipificación, no estando relacionada con el origen geográfico, de igual manera el porcentaje de tipificación vario entre un 43,3 a un 54,3 % al relacionarlo con las manifestaciones o formas clínicas de la enfermedad (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de tipificación de la PCR-RFLP *hsp70* UDT en función del origen geográfico y las manifestaciones clínicas o formas clínicas de la enfermedad.

		PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT	% Tipificación
Origen geográfico	México n= 110	53	48.2
	Colombia n= 50	20	40.0
	Bolivia n=30	19	63.3
	Argentina n=2	1	50.0
	Belice n=1	1	100
Manifestaciones clínicas o formas clínicas de la enfermedad	Forma cardiaca n=69	27	43.3 %
	Forma digestiva n=19	10	52.6%
	Forma indeterminada n=105	57	54.3%
% TIPIFICACIÓN n=193		94	48.7 %

5.4. Asociación de las UDT de *T. cruzi* con el origen geográfico y la presentación clínica de la enfermedad.

En correspondencia con el origen de las muestras, la tabla 7, muestra los resultados de tipificación de las muestras amplificadas por la PCR *hsp70* UDT.

Al analizar los linajes circulantes en las 53 muestras clínicas procedentes de México que se tipificaron basado en el gen de la *hsp70*, el 90,6 % de las muestras (48 muestras) correspondieron al linaje TcI, reportándose además en una muestra con el linaje TcIII y otra muestra con el linaje TcIV. Se reportaron además 3 infecciones mixtas, 2 muestras correspondiente a los linajes TcI+TcII y una muestra correspondiente con los linajes TcI+ TcV o TcVI.

En las 20 muestras clínicas tipificadas procedentes de Colombia, el 50 % de las muestras (10 muestras) correspondieron con el linaje TcI, seguidas de 4 muestras correspondientes con el linaje TcII (20%), 2 muestras correspondientes con los linajes TcIV y TcV o TcVI cada uno (10 %) y una muestra correspondiente con el linaje TcIII. Dentro de las muestras de Colombia también se reportó una infección mixta correspondiente con los linajes TcI+TcIV.

Con relación a las muestras procedentes de Bolivia, las 19 muestras tipificadas mostraron un predominio de los linajes TcV o TcVI en 13 muestras clínicas (68,4%), seguidamente se encontraron 4 muestras clínicas correspondientes al TcI (21,1%) y una muestra correspondiente con TcIV. Una infección mixta correspondiente con los linajes TcI+TcII fue también reportada en el grupo de muestras tipificadas en este país.

Finalmente, una de las muestras clínicas procedentes de Argentina correspondió con el linaje TcV o TcVI y la muestra clínica de Belice correspondió con el linaje TcI.

Tabla 7. Resultado de los UDTs encontradas en las muestras clínicas en función del origen geográfico.

	PCR-RFLP <i>hsp70</i> UDT	UDTs
México n= 110	53	48 Tc-I 1 Tc-III 1 Tc-IV 2 mixtos Tc-I/Tc-II 1 mixto Tc-I/Tc-V o VI
Colombia n= 50	20	10 Tc-I 4 Tc-II 1 Tc-III 2 Tc-IV 2 Tc-V o VI 1 mixto Tc-I/Tc-IV
Bolivia n=30	19	13 Tc-V o VI 4 Tc-I 1 Tc-IV 1 mixto Tc-I/Tc-II
Argentina n=2	1	1 Tc-V o VI
Belice n=1	1	1 Tc-I

Al analizar la asociación entre las UDTs detectadas en las muestras clínicas de los pacientes en función de las formas clínicas de la enfermedad, se pudo determinar que la mayoría de los pacientes con EC crónica determinada cardiaca presentaban el linaje TcI (85,2%), seguido de dos pacientes con linaje TcIV (7,4%), un paciente con el linaje TcIII y otro con el linaje TcV o TcVI. No se encontraron pacientes con manifestaciones cardiacas con los linajes TcII o

infecciones mixtas. De esta forma la UDT TcI tiene una asociación estadísticamente significativa con la forma crónica determinada cardiaca (Fisher $p = 0.0277$) (Tabla 8).

Con relación a los pacientes con EC crónica determinada digestiva, la mayoría de los pacientes estaban infectados con los linajes TcV o TcVI (90,0%), seguido de un paciente con el linaje TcII. Asociado a esta forma clínica no se encontraron pacientes infectados con los linajes TcI, TcIII o TcIV, ni infecciones mixtas. Encontrándose entonces una asociación estadísticamente significativa entre la UDT TcV o VI con la forma digestiva (Fisher $p < 0.00001$). De los pacientes estudiados ninguno presentó la forma cardiaca y digestiva por lo que no se pudo estudiar la asociación de esta forma clínica con la presencia de las UDTs del parásito (Tabla 8).

Finalmente, en los pacientes con EC crónica indeterminada o asintomática se encontraron todos los linajes del parásito. Mayoritariamente el TcI (70,2%) fue encontrado en las muestras de pacientes correspondientes a esta forma clínica seguida de 6 pacientes infectados con TcV o TcVI, 3 pacientes con TcII, 2 pacientes con TcIV, 1 paciente con TcIII y las 5 infecciones mixtas estaban relacionadas con pacientes en esta fase o forma clínica de la enfermedad. De esta forma no se encontró una asociación estadísticamente significativa entre las UDTs y la forma indeterminada (Fisher $p = 0.5022$) (Tabla 8).

Tabla 8: Distribución de UDT detectadas en muestras clínicas de pacientes procedentes de México, Colombia, Bolivia, Argentina y Belice en función de las formas clínicas.

		No	TcI	TcII	TcIII	TcIV	TcV o VI	Mixtos
Formas clínicas	Cardiaca	27	23 (85.2%)	0	1 (3.7%)	2 (7.4%)	1 (3.7%)	0
	Digestiva	10	0	1 (10%)	0	0	9 (90.0%)	0
	Asintomático (Indeterminada)	57	40 (70.2%)	3 (5.3%)	1 (1.8%)	2 (3.5%)	6 (10.5%)	5 (8.8%)

6. DISCUSIÓN

En la actualidad, la alta variabilidad genética del *T. cruzi* permite su clasificación en siete linajes diferentes, así: seis UDT (Discrete Typing Units), desde TcI hasta TcVI, y un séptimo genotipo, TcBat han sido descritos (Zingales et al., 2009; Macili et al., 2009; Zingales, 2018). A partir de esta clasificación, ha sido motivo de estudio, la distribución geográfica de las diferentes UDT, su relación con los ciclos de transmisión, el impacto de la diversidad genética en las manifestaciones clínicas de la EC, en el diagnóstico serológico y en la susceptibilidad a las drogas antiparasitarias utilizadas (Zingales, 2018). De forma general la identificación de las UDT presentes y la diversidad dentro de ellas es importante, ya que diferentes genotipos pueden causar diferentes patologías y circular en diferentes lugares y ciclos de transmisión, afectando los esfuerzos de control, tratamiento y desarrollo de vacunas (Dorn et al., 2017).

Hoy, la fisiopatología de la EC es aún un misterio por resolver y la descripción de los diferentes genotipos de *T. cruzi* sumó una piedra fundamental en el camino hacia la comprensión de esta enfermedad (Nielebock et al., 2020). Por lo tanto, es necesario el esclarecimiento de cuáles UDT de *T. cruzi* están asociadas a las diferentes presentaciones crónicas de la enfermedad de Chagas y sus resultados. Si bien, cualquier linaje de *T. cruzi* puede infectar a humanos, TcI, TcII, TcV y TcVI son las UDT más asociadas a infecciones humanas en ciclos domiciliarios de transmisión en áreas endémicas (Zingales et al., 2012; Messengers et al., 2015). Algunos estudios describen la distribución geográfica de las UDT de *T. cruzi* para identificar asociaciones epidemiológicas entre los genotipos (Carrasco et al., 2012; Bizai et al., 2020). Otros se centran en la dinámica de los parásitos realizando estudios filogeográficos para comprender su evolución y el riesgo de infección en humanos (Izeta-Alberdi et al., 2016), pero la última actualización de la distribución y epidemiología de las UDT a nivel continental después de la publicada en 2016 por Izeta-Alberdi y colaboradores fue en el meta-análisis desarrollado por Velásquez-Ortiz y colaboradores (2022). En este meta-análisis se presenta una actualización de la distribución de UDT en las Américas incluyendo un mapa de distribución para Tcbat, registrado predominantemente en Colombia y Brasil, su información eco-epidemiológica como el ciclo de transmisión, huéspedes, vectores, y los métodos y marcadores genéticos utilizados para su identificación y genotipado. Este estudio pretende brindar información que conduzca a la estandarización de la identificación de UDT para mejorar las futuras investigaciones con respecto a la epidemiología molecular de la EC, alentando a la comunidad científica a seguir estudiando la epidemiología molecular de *T. cruzi* para el manejo y vigilancia más precisa de la EC en regiones endémicas (Velásquez-Ortiz et al., 2022).

Como consecuencia de la ratificación de la nomenclatura estandarizada para las siete UDT de *T. cruzi* por parte de un comité de expertos (Zingales et al., 2009), y las necesidades investigativas relacionadas con determinar el papel de la diversidad genética y su impacto en aspectos geográficos, eco-epidemiológicos y del desarrollo de la EC su diagnóstico y tratamiento se hizo imperativo desarrollar una estrategia de genotipado confiable que pudiera

ser adoptada por la comunidad científica (Zingales et al., 2012). Considerando la distinta distribución geográfica de las UDT (Zingales, 2018), el diagnóstico genotipo específico de la enfermedad de Chagas es relevante para implementar vigilancia epidemiológica y estrategias más precisas para el control de la enfermedad en áreas endémicas. Además, los métodos de genotipado también pueden ser útiles para establecer el pronóstico clínico de una infección en curso, ya que diferentes UDT de *T. cruzi* se han asociado con distinta gravedad de la enfermedad de Chagas (Lages-Silva et al., 2006; Miles et al., 2009; Monje-Rumi et al., 2015). Además, considerando la susceptibilidad divergente de las UDT de *T. cruzi* al tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas (Toledo et al., 2003; Martins et al., 2007; Miles et al., 2009; Zingales y Macedo, 2023), las metodologías utilizadas para el diagnóstico genotipo específico de la infección por *T. cruzi* son importantes para el seguimiento postterapéutico de los pacientes tratados. A lo largo de los últimos años, se han desarrollado varios esquemas de tipificación. Primero se propuso (Brise et al., 2009) un sistema de ensayo de PCR basado en la amplificación de regiones particulares del gen SL y 24S α -rDNA (Souto et al., 1996) y 18S rDNA (Clark et al., 1994) en el que los polimorfismos de tamaño de los productos de amplificación eran adecuados para la asignación de *T. cruzi* en cada una de las seis UDT. También se propuso un análisis multilocus PCR-RFLP del polimorfismo genético de 12 loci para el genotipado de UDT (Rozas et al., 2007). Además, se propuso una estrategia de tipificación secuencial de tres marcadores que consiste en la amplificación por PCR del 24S α -rDNA y la PCR-RFLP de la proteína de choque térmico 60 y los loci de glucosa-6-fosfato isomerasa (Lewis et al., 2009). Yeo et al. (2011) y Lauthier et al. (2012) diseñaron esquemas de tipificación de secuencias multilocus (MLST) en los que la información de secuencia de 4 a 10 genes de mantenimiento de una sola copia permitió la resolución de las seis UDT. Se ha publicado un ensayo que utiliza un gen de una sola copia (TcSC5D) seguido de dos reacciones de RFLP (Cosentino et al., 2012). Sin embargo, la mayoría de los ensayos mencionados anteriormente son complejos de realizar y se han aplicado solo a parásitos cultivados. Otro esquema que utiliza ensayos de PCR anidados permite la tipificación directa de UDT en muestras biológicas (Marcet et al., 2006; Cardinal et al., 2008) y clínicas (Burgos et al., 2007; 2010), pero requiere entre 3 y 9 reacciones de PCR secuenciales. Posteriormente se desarrolló por Cura y colaboradores (2015) un método de PCR en tiempo real MTq-PCR que identifica las seis UDT de *T. cruzi* en una o dos reacciones secuenciales con sensibilidad adecuada para analizar diferentes tipos de muestras biológicas, como las derivadas de vectores triatominos y diferentes tipos de vida silvestre, así como muestras clínicas de pacientes. Sin embargo, aun cuando se han utilizado diferentes estrategias para la identificación de las UDT de *T. cruzi* y existen métodos sencillos de genotipificación para identificar la UDT que ahora están disponibles para su uso generalizado en áreas endémicas, es necesario que se continúe investigando para optimizar técnicas más sensibles y simplificadas que permitan la identificación y diferenciación de las UDT para aplicarlas directamente a muestras clínicas y biológicas (Zingales et al., 2012).

El algoritmo PCR-RFLP que propusimos y evaluamos basado en el gen *hsp70* permite en dos pasos diferenciar las UDT TcI, TcII, TcIII y TcIV, pero no es posible discriminar las UDTs TcV y

TcVI. Estos resultados se corresponden con los grupos genéticos obtenidos en el análisis filogenético previamente informado por Fraga y colaboradores (2016; 2021) basado en el gen *hsp70*. Como TcV y TcVI han surgido por un proceso de hibridación más reciente de TcII y TcIII (Brisse et al., 2000; Westenberger et al., 2005; Flores-López y Machado, 2011; Ferreira y Briones, 2012), no sorprende que sus secuencias correspondientes al gen *hsp70* están vinculados a uno de los dos linajes. TcV y TcVI están claramente asociados con la enfermedad de Chagas en humanos en países del sur de América del Sur. Sin embargo, algunos casos humanos la infección con TcV y/o TcVI se informó más al norte de Ecuador (Garzón et al., 2002) y Colombia (Guhl y Ramírez, 2013). Se ha demostrado en diferentes estudios que estos linajes están más relacionados con la forma digestiva de la enfermedad (Monje-Rumi et al., 2020). Estas UDT resultaron de al menos un evento de hibridación más reciente, que se estima que ocurrió hace 0,9 millones de años (de Freitas et al., 2006) y muestran una diversidad mínima dentro del linaje (Zingales, 2018; Zingales y Macedo, 2023).

La PCR-RFLP *hsp70* UDT permitió detectar infecciones simples en la mayoría de las muestras clínicas analizadas (94,6%) pero también fue capaz de detectar infecciones mixtas de UDTs (más de una UDT en un solo paciente) del parásito, correspondiendo el 5,4% de las muestras analizadas a infecciones mixtas del parásito de muestras procedentes de México, Colombia y Bolivia de las 94 muestras tipificadas de diferentes orígenes geográficos. Estos países resultan en los que se estudiaron un mayor número de muestras clínicas en nuestro estudio, Argentina y Belice que solo se estudiaron dos y una muestra respectivamente no puede ser tenida en cuenta en nuestro análisis. Resultados similares han sido publicado por diferentes autores que encontraron valores de infecciones mixtas en sus poblaciones de estudio en pacientes que cursan la infección crónica de 5,66% (3/53 muestras Panamá), 6,7% (27/400 Colombia) y 7,3 % (29/402 muestras Chile) (Hernández et al., 2016; Muñoz-San Martín et al., 2018; Prescilla Ledezma et al., 2020). De forma general la presencia de infecciones mixtas en pacientes que cursan la fase crónica de la enfermedad de Chagas ha sido reportado por diferentes autores en estudios realizados en Argentina, Colombia, Chile, Brasil, Bolivia y Panamá y las infecciones mixtas se han encontrado entre un 5 y un 21,6% de las muestras analizadas (Bontempi et al., 2016; Del Puerto et al., 2010; Martínez Pérez et al., 2016; Monje-Rumi et al., 2015; Hernández et al., 2016; Muñoz-San Martín et al., 2018; Prescilla Ledezma et al., 2020).

En las infecciones naturales por *T. cruzi*, es fundamental considerar que las infecciones mixtas con múltiples UDT son comunes y pueden provocar cambios en las propiedades biológicas del parásito, así como en el curso clínico de la enfermedad de Chagas (Martins et al., 2008; da Silveira Pinto et al., 2000; de Lana et al., 2000; Sales-Campos et al., 2014). Algunos estudios han demostrado que los clones de *T. cruzi* con menor capacidad de desarrollarse en huéspedes invertebrados y vertebrados durante infecciones monoclonales pueden multiplicarse en infecciones mixtas (da Silveira Pinto et al., 2000, de Lana et al., 2000; Pérez et al., 2018). Se ha demostrado "in vivo" que el tropismo tisular de una UDT de *T. cruzi* podría cambiar en presencia de otras UDT (Franco et al., 2003). Además, el daño histopatológico y la intensidad del proceso

inflamatorio resultante de estas infecciones mixtas por *T. cruzi* también presentan variaciones notables (Andrade et al., 2006; Rodríguez et al., 2010).

Uno de los principales desafíos en la genotipificación de muestras biológicas es la identificación de infecciones mixtas por diferentes UDT de *T. cruzi* (Monje-Rumi et al., 2015). Algunos métodos que emplean biología molecular pueden detectar infecciones mixtas por *T. cruzi*, como los utilizados en el protocolo propuesto por D'Ávila et al. (2009) (Andrade et al., 2011; Sá et al., 2016). Andrade et al. (2011) utilizaron la técnica PCR-RFLP del gen de la citocromo oxidasa de la subunidad II y analizaron el polimorfismo del gen 24S α -LSU rDNA, así como el polimorfismo del espaciador intergénico mini-exón SL-IL, para demostrar infecciones mixtas con UDT TcI + TcIII y TcII + TcVI de *T. cruzi* en parásitos aislados de pacientes con enfermedad de Chagas aguda, triatomíneos y reservorios silvestres. Estudios anteriores han demostrado infecciones mixtas por *T. cruzi* mediante amplificación por PCR de ADNk y posterior hibridación utilizando sondas específicas de UDT (UDT-blot) (Solari et al., 2001; Ortiz et al., 2015), PCR en tiempo real con sondas Taq-Man (MTq-PCR) (Cura et al., 2015), y la amplificación de otros objetivos del genoma del parásito, como el gen cSC5D mediante PCR-RFL (Cosentino et al., 2012). La técnica de PCR-RFLP hsp70 UDT, permite la detección de infecciones mixtas lo que le adiciona un valor positivo a este método.

Al analizar el porcentaje de tipificación obtenido de muestras clínicas de pacientes con enfermedad crónica utilizando la técnica de PCR-RFLP hsp70 UDT pudo tipificar el 48,7% de las muestras analizadas (94/193). Lo que consideramos un resultado apropiado teniendo en cuenta la baja carga parasitaria que contienen los pacientes en esta fase de la enfermedad. Resultados similares fueron obtenidos previamente por Morales (2023) al evaluar este método en 55 muestras de vectores, reservorios animales y humanos recolectados de Bolivia, Belice, Colombia y México obteniéndose un porcentaje de tipificación del 54,5 % en general y de 46,6% al estudiar 30 pacientes en nuestras condiciones de laboratorio. Esta observación puede estar estrechamente relacionada con la sensibilidad de los métodos de tipificación de *T. cruzi* UDT obtenidos directamente de sangre periférica total. Datos obtenidos por Zulantay y colaboradores (2022), como experiencia en al menos dos años de trabajo experimental, indicaron que no es posible genotipar poblaciones circulantes de menos de 10 pares. eq./ml. Considerando que un alto porcentaje de individuos con EC crónica presentan una carga parasitaria por debajo de este límite de detección (Saavedra et al., 2016), un gran porcentaje de casos no pudo ser genotipado. Al analizar en muestras de pacientes los porcentajes de tipificación varían en función del algoritmo de tipificación utilizado y la fase en la que se encuentra el paciente. Cura y colaboradores (2015) utilizando la técnica de MTq-PCR tipificó el 29,6% de las muestras de pacientes en fase crónica, sin embargo, el porcentaje de tipificación subió a 62,5% (10/16) y 100% (n=13) para niños con infección congénita y para pacientes en etapa aguda. Valores de tipificación de 48,8% en muestras de humanos han sido reportado por Izeta-Alberdi y colaboradores (2023), al utilizar la secuenciación de los marcadores genéticos kDNA, ME, 18S y 24S α en muestras de pacientes procedentes de México. Por su parte Del Puerto y

colaboradores (2010) al analizar pacientes bolivianos con EC crónico encontraron un 64,1% de tipificación (196/306 muestras) al utilizar la técnica de PCR mini-exon combinada con "western blot". Valores ligeramente superiores han sido reportados por Martínez-Perez y colaboradores (2016) al analizar migrantes bolivianos en España quienes obtuvieron un porcentaje de tipificación de 70,5% (105/149 muestras) al utilizar el algoritmo que combina la PCR de la región intergenica de los minixones, 24S α , 18S y la región variable del ADN satelital. Similar a estos valores fueron reportados por Burgos y colaboradores (2007) en pacientes en fase crónica de la enfermedad (77,3%) al utilizar un esquema de tipificación en los que involucra PCR, nest-PCR y PCR en tiempo real y por Prescilla Ledezma y colaboradores (2020) al detectar los linajes de *T. cruzi* en pacientes panameños en fase crónica de la enfermedad (78,7%) utilizando igualmente el esquema de tipificación propuesto por Burgos y colaboradores (2020). Valores aún superiores, 93,2% han sido reportados por Bizai y colaboradores (2019) al analizar 104 pacientes en fase crónica de la enfermedad utilizando el esquema de tipificación convencional (Díaz et al., 2010), iguales valores han sido reportados por Botempi y colaboradores (2016) al analizar 32 muestras de pacientes con enfermedad en fase crónica. Futuros estudios en donde se evalúen un mayor número de pacientes correspondientes a las diferentes formas de la enfermedad aguda, crónica, congénita y oral.

Al analizar las muestras tipificadas procedentes de México (n=53), la UDT predominante resulto la TcI (90,6%), seguido de TcIII y TcIV, además de dos con infección mixta TcI+TcII y una infección mixta TcI+TcV o TcVI. En México hay muy pocos reportes de detección de UDT de *T. cruzi*, sin embargo, Breniere y colaboradores (2016), al analizar 34 muestras de pacientes todas las muestras pertenecían al linaje TcI (Breniere et al., 2016). Otros estudios han demostrado solo la presencia del linaje TcI en muestras de pacientes (Martínez et al., 2013; Jaime et al., 2022; Becker et al., 2023; Moo-Millan et al., 2024). En muestras de pacientes se han reportado *T. cruzi* del linaje TcII en dos casos con lesión cutánea prolongada en la fase aguda de la enfermedad (Rangel-Gamboa et al., 2019; 2023). Herrera y colaboradores (2019), al analizar filogenéticamente muestras de pacientes utilizando el gen minixon encontraron que las muestras se agrupaban en un grupo filogenético correspondiente con los linajes TcII, TcV y TcVI, reportándose además infecciones mixtas de dos de las muestras analizadas con TcI. Nuestro estudio corresponde el primer estudio donde se reportan muestras de paciente con linajes TcIII y TcIV, además de TcII y TcV o TcVI que ya han sido reportadas previamente. De igual manera en este nuestro estudio se encontraron infecciones mixtas solo reportadas con anterioridad por Herrera y colaboradores (2019) y que corresponde con TcI con TcII, TcV o TcVI.

En las muestras tipificadas procedentes de Colombia (n=20), utilizando la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT, se encontró que el linaje predominante fue TcI (50,0%), seguido a este, se reportaron los linajes TcII (20,0%), TcIV (10,0%), TcIV o TcVI (10,0%) y TcIII (5,0%). Las UDT TcI, TcII, TcIV y TcVI han sido reportados en Colombia en pacientes, siendo las más reportados TcI (77,6%), seguido de TcII (15,2%), TcIV (5,42%), y TcVI (0,8%) (Breniere et al., 2016). Otros

estudios, han encontrado estos mismos linajes en pacientes y en todos los estudios predomina la presencia de TcI (Ramírez et al., 2010; Gulh y Ramírez 2013; Ramírez et al., 2013; Bianchi et al., 2015; Hernández et al., 2016; Panesso-Gomez et al., 2018; Inga y Oliveira, 2019., Rincón-Acevedo et al., 2021; Urbano et al., 2024). Por su parte en nuestro estudio se reportó la presencia de TcIII en una muestra de paciente, resultados similares fueron reportados con anterioridad en cinco pacientes infectados crónicos en Colombia que presentan miocardiopatía, pero en infección mixta con TcV (Ramírez et al., 2010) y Gulh y Ramírez (2013) y Hernández y colaboradores (2016), quienes reportaron TcIII en el 1,6% (3 muestras) y el 1,5% (6 muestras) de las muestras estudiadas en cada uno de los estudios (236 y 400 muestras respectivamente). En las muestras clínicas estudiadas en nuestro estudio se encontraron además 1 infección mixta de los linajes TcI y TcIV, reportados con anterioridad por otros autores (Ramírez et al., 2010; Gulh y Ramírez, 2013; Hernández et al., 2016).

En el caso de las muestras tipificadas de Bolivia (n=19) procedentes de humanos con EC crónica, el linaje predominante encontrado fue el TcV o VI (68,4%) seguido de TcI (21,1%) y TcIV (5,3%), además de una infección mixta TcI+TcIV en este estudio. En este país se ha reportado mayoritariamente las UDT TcV (68,2%), seguido de TcI (23,2%), TcIV (3,8%), TcII (3,5%) y finalmente TcVI (1,36%) en muestras clínicas de pacientes (Breniere et al., 2016). Otros estudios demuestran este comportamiento diferencial en humanos, no encontrando el linaje TcIII y con la presencia de infecciones mixtas (Breniere et al., 1995; 2012; Del Puerto et al., 2010; Pérez et al., 2013; Perez-Molina et al., 2014; Martínez-Pérez et al., 2016; Abras et al., 2017; Tavares de Oliveira et al., 2020; Sánchez et al., 2022).

La muestra de paciente procedente de Argentina analizada en nuestro estudio correspondió con el linaje TcV o TcVI, ya que no se puede diferenciar los linajes TcV y TcVI utilizando el PCR-RFLP *hsp70* UDT. En Argentina se han reportado los linajes TcI, TcII, TcV y TcVI en muestras clínicas de pacientes, siendo el linaje más encontrado el TcV (53,6%), seguido del linaje TcVI (25,0%), el TcI (16,6%) y finalmente TcII con solo 4,76% (Breniere et al., 2016). Resultados similares a este han sido reportados por otros autores quienes además han reportado infecciones mixtas de los linajes circulantes fundamentalmente TcII+TcV+TcVI y TcV+TcVI (Cura et al., 2015; Monjes-Rumi et al., 2015; Botempi et al., 2016; Lucero et al., 2016; Herrera et al., 2019; Mauchiaverna et al., 2018; Bizai et al., 2020; Monjes-Rumi et al., 2020).

Por su parte, no existen estudios que determinen las UDT circulantes en Belice. Solo ha sido reportado por Dorn y colaboradores (2017), la presencia de la UDT TcI en 7 muestras de *T. dimidiata* y TcII en 2 muestras de esta misma especie de Triatomineo. En nuestro estudio solo una muestra de un paciente con EC crónico indeterminado fue tipificado, resultando ser TcI.

De forma general los resultados de la tipificación de las UDTs de *T. cruzi* encontrados utilizando la PCR-RFLP *hsp70* UDTs está en correspondencia con los reportes realizados en cada uno de los países cuyas muestras fueron analizadas. En 2022, Velásquez-Ortiz y colaboradores

realizaron una revisión sistemática de la literatura de los últimos 20 años y actualizaron los conocimientos sobre la distribución de las UDTs en las Américas. Mapas cuidadosamente compilados indican que las UDTs están muy extendidas en todo el continente. La distribución geográfica de las UDTs que se encuentran con mayor frecuencia en pacientes de países endémicos de la enfermedad de Chagas se ha abordado en varios artículos de revisión (Messenger y Miles, 2015; Breniere et al., 2016; Izeta-Alberdi et al., 2016; Zingales 2018; Magalhães et al., 2022). En una revisión reciente de Magalhães y colaboradores (2022), se presentó un panorama actualizado de la distribución geográfica de las UDTs de *T. cruzi* en humanos, un mapa ilustrativo y referencias recientes. Como resumen de estos artículos el linaje TcI predomina en casos humanos autóctonos de Estados Unidos, México y países de Centroamérica. En Sudamérica existe mayor diversidad de UDTs. TcI es responsable de la mayoría de las infecciones humanas en la cuenca del Amazonas, los países del norte de América del Sur (Venezuela y Colombia), así como en pacientes de los países del Cono sur. Dada la considerable diversidad genética de TcI, es probable que en estas regiones circulen diferentes subpoblaciones de TcI. En Bolivia, además de TcI, las UDTs TcII, TcV y TcVI también infectan a humanos. En muestras de sangre periférica de pacientes chilenos se detectaron TcII, TcV y TcVI en infecciones únicas o mixtas. Tanto TcV como TcVI son las principales UDTs del ciclo doméstico en Argentina. En las regiones sur y sureste de Brasil, TcII se reporta con mayor frecuencia en infecciones humanas, mientras que TcIV predomina en pacientes de la región norte. Curiosamente, la UDT TcIV es la segunda causa más común de enfermedad de Chagas en Venezuela y Colombia. Las UDTs por *T. cruzi* también se han estudiado en inmigrantes bolivianos que asistían a hospitales en España y el linaje TcV fue la UDT más comúnmente encontrada (Abrás et al., 2017; Tabares de Oliveira et al., 2020).

La distribución geográfica diferencial de las UDTs en pacientes refleja las interacciones huésped-patógeno, que incluyen las características genéticas de ambos jugadores. Esto anticipa variaciones regionales en la respuesta de anticuerpos del huésped, lo que, a su vez, afectaría el desempeño de varias pruebas de diagnóstico serológico comerciales. De hecho, en los países de América Latina se ha reportado una variabilidad considerable en la sensibilidad de las pruebas de diagnóstico actuales (Zingales 2018; Majeau et al., 2021). Por lo tanto, se recomienda evaluar la realización de pruebas serológicas comerciales en países endémicos de la enfermedad de Chagas, y que la validación de nuevas pruebas diagnósticas incluya sueros de pacientes de países endémicos (Zingales y Macedo, 2023).

Uno de los objetivos principales al clasificar las cepas de *T. cruzi* en linajes principales o UDTs siempre ha sido explorar sus posibles implicaciones en la determinación de las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. A pesar de algunos avances, nuestra capacidad para sacar conclusiones definitivas sigue siendo algo limitada. Si bien la esperanza inicial de encontrar diferentes UDTs responsables de distintas formas clínicas de la enfermedad no se materializó, algunas UDTs parecen contribuir a aumentar el riesgo de ciertas morbilidades en comparación con otras. Por otro lado, dado que las interacciones entre el patógeno y el

huésped son complejas y hay varios aspectos desconocidos que influyen en el destino de las infecciones, la interacción entre el patógeno y la respuesta inmune del huésped debe ser crítica para determinar la evolución de la enfermedad (Zingales y Macedo, 2023).

Desde una perspectiva global, es interesante observar que la distribución geográfica de los principales linajes de *T. cruzi*, resumida anteriormente, refleja fielmente el gradiente de gravedad de la enfermedad de Chagas dentro de este rango. La alineación entre la distribución de las UDT de *T. cruzi* y la gravedad de la enfermedad ha llevado a una asociación general, aunque no absoluta, de TcI con enfermedades cardíacas crónicas agudas y/o más leves y de TcII, TcV y TcVI con enfermedades cardíacas o digestivas crónicas más graves. Por su parte TcIII, TcIV y especialmente TcBat rara vez se asocian con infecciones humanas (Macedo y Segatto, 2010; Zingales y Macedo, 2023).

El curso clínico de la enfermedad de Chagas es polimórfico y varía desde asintomático hasta afectación cardiovascular o gastrointestinal crónica grave. Después de la transmisión del parásito, las formas tripomastigotes de *T. cruzi* pueden invadir diferentes tipos de células, incluidos macrófagos, células musculares y fibroblastos. La amplificación parasitaria en el citosol produce un intenso parasitismo tisular y parasitemia sanguínea durante la fase aguda. Los síntomas en esta fase son generalmente leves, excepto en pacientes inmunodeprimidos y niños que pueden desarrollar miocardiopatía y encefalomiелitis (Andrade y Andrew 2005; Coura, 2007). Después de la fase aguda, la parasitemia disminuye en la fase crónica de la enfermedad, comenzando con la forma asintomática o indeterminada, donde no se observan síntomas clínicos. La mayoría de las personas permanecen en esta fase de infección durante el resto de sus vidas. Aproximadamente el 30% de estos pacientes desarrollan enfermedad en fase crónica con síntomas cardíacos y/o gastrointestinales. Esta afectación puede ser grave y determinante de la morbilidad de la enfermedad (Dias y Coura, 1997; Prata, 2001; Rassi et al., 2012).

La miocardiopatía es una de las alteraciones clínicas más importantes en los pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica debido a la alta frecuencia con la que se desarrolla (en el 20-30% de los individuos infectados), además de su gravedad, morbilidad y mortalidad (Bonney et al., 2019). Las respuestas inmunes innata y adaptativa del huésped pueden contribuir al daño cardíaco y aumentar el riesgo de insuficiencia cardíaca mediante la inducción de inflamación, fibrosis y lesión por estrés oxidativo, lo que lleva a la ruptura de miofibrillas, necrosis de cardiomiocitos, disfunción microvascular, disfunción autonómica, hipertrofia cardíaca y fibrosis (Bonney et al., 2019).

En nuestro estudio se pudo observar que la mayoría de los pacientes con EC crónica determinada cardíaca presentaban el linaje TcI (85,2%), resultando que la UDT TcI tiene una asociación estadísticamente significativa con la forma crónica determinada cardíaca (Fisher $p = 0.0277$). No se encontraron pacientes con manifestaciones cardíacas con los linajes TcII o en infecciones mixtas, quizás por el número de pacientes estudiados y el sesgo de las áreas

geográficas que se pudieron estudiar. Resultados similares a este han sido reportados con anterioridad por Ramirez y colaboradores (2010), Muñoz-San Martín y colaboradores (2018) en estudios realizados en Colombia y Chile respectivamente.

El linaje TcI es la UDTs más extendida, como se mencionó con anterioridad, prevaleciendo en ciclos selváticos y/o domésticos en México, América Central y países dentro de la región amazónica (Brenière et al., 2016; Balouz et al., 2021). El papel específico de la TcI en la determinación de las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas no se comprende completamente, pero se ha atribuido a su predominio la rareza de los megasíndromes (megaesófagos y megacolon) en regiones donde prevalece la TcI. Por otro lado, la aparición de enfermedades cardíacas asociadas con TcI ha sido ampliamente documentada en algunos países de la región amazónica, particularmente en Colombia y Venezuela (Ramírez et al., 2010). Los estudios que involucran la tipificación de *T. cruzi* directamente en muestras de corazón de pacientes chagásicos cardíacos que se sometieron a un trasplante de corazón han revelado que la infección mixta con TcI y TcII es más común de lo que se anticipó inicialmente en estos países. Este descubrimiento ha llevado a la hipótesis de que la aparición de manifestaciones cardíacas en pacientes infectados con TcI podría explicarse, al menos en parte, por la presencia de infecciones mixtas (Zafra et al., 2008; Mantilla et al., 2010). Sin embargo, los casos de enfermedad y muerte debido a TcI, incluso en regiones donde TcII es escaso o ausente, indican que la patogenicidad es una característica inherente de las cepas de TcI (Calvopina et al., 2020). Además, las manifestaciones de la miocardiopatía chagásica parecen estar más fuertemente correlacionadas con TcI que con TcII, al menos en Colombia (Ramírez et al., 2010).

Curiosamente, a diferencia de las regiones endémicas ubicadas sobre la selva amazónica, las infecciones humanas crónicas por cepas de TcI parece ser raras y típicamente asintomáticas en los países del Cono Sur, donde prevalecen TcII, TcV y TcVI. En estas regiones, la TcI sólo se asocia ocasionalmente con casos agudos graves, y la mayoría de ellos son el resultado de brotes de infección oral y la incursión de roedores selváticos en las casas. También se ha detectado TcI en asociación con casos reactivados de la enfermedad de Chagas en individuos gravemente inmunocomprometidos, particularmente en casos de complicaciones del sistema nervioso central y meningoencefalitis (Burgos et al., 2008). Las explicaciones de por qué la TcI se asocia con casos clínicos en algunas regiones endémicas y no en otras aún están por aclararse. En nuestro estudio la mayoría de los pacientes a los que se les identificó su linaje pertenecían a la UDT TcI, 23 estaban relacionados con la forma cardíaca procedentes de México, Colombia, Bolivia y 40 estaban relacionados con la EC crónica indeterminada procedentes de México, Colombia, Bolivia y Belice.

En este contexto, se ha atribuido a TcI una heterogeneidad genética sustancial, como lo demuestran varios estudios (Herrera et al., 2007; Ocaña-Mayorga et al., 2008; Llewellyn et al., 2009; Cura et al., 2010; Roman et al., 2018). Esta diversidad genética es evidente en estudios

localizados realizados en diferentes regiones, incluidos México (Bosseno et al., 2002), Colombia (Herrera et al., 2007), Venezuela y Bolivia (Llewellyn et al., 2009). Sobre la base de estos estudios, se han informado intentos de subdividir las cepas de TcI en grupos clínicamente relevantes. Los resultados iniciales parecían prometedores, con algunos haplotipos, particularmente TcIDOM (anteriormente TcIa), asociados con el ciclo de transmisión doméstica/peridoméstica e infecciones humanas en regiones como Colombia (Falla et al., 2009; Villa et al., 2013) y Venezuela (Llewellyn et al., 2009). Sin embargo, estudios adicionales realizados en otras áreas endémicas han cuestionado la confirmación de esta asociación (Messenger et al., 2012; Calzada et al., 2022). Lamentablemente con la PCR-RFLP *hsp70* UDT solo llegamos a nivel de diferenciar UDTs y no vemos la heterogeneidad dentro de TcI que podrá ser abordado en futuros estudios.

En nuestro estudio encontramos además que los pacientes con EC crónica determinada digestiva, la mayoría estaban infectados con los linajes TcV o TcVI (90,0%). Asociado a esta forma clínica no se encontraron pacientes infectados con los linajes TcII, TcIII o TcIV, ni infecciones mixtas. Encontrándose entonces una asociación estadísticamente significativa entre la UDT TcV o VI con la forma digestiva (Fisher $p < 0.00001$). Desafortunadamente con la PCR-RFLP *hsp70* UDT no es posible diferenciar los linajes TcV y TcVI, por lo que quedan agrupados y tendrían que utilizarse otros métodos moleculares para su diferenciación. Aunque teniendo en cuenta la procedencia y las manifestaciones clínicas de las muestras que dieron el patrón TcV o TcVI estas deben corresponderse mayoritariamente con el linaje TcV, pero se necesita su confirmación molecular. Resultados similares ha sido reportado por Monje-Rumi y colaboradores (2020) en un estudio desarrollado con 88 pacientes argentinos confirmados con EC. Además, TcVI, junto con TcV, ya había sido asociado con la forma digestiva de la EC en Argentina (Vicco et al., 2012). Esto ya había sido descrito por Miles y colaboradores (1981) quien reportaron que ya que las formas digestivas estaban asociadas a infecciones donde las UDTs TcII, TcV y TcIV fueron identificadas.

El TcV desempeña un papel importante en las infecciones humanas, especialmente en la región del Gran Chaco y los países vecinos, incluidos Bolivia, Chile, el norte de Argentina y el sur de Brasil (Virreira et al., 2006; Cardinal et al., 2008; Monje-Rumi et al., 2015). Por ejemplo, los megasíndromes en Bolivia están predominantemente asociados con TcV y, en menor medida, con TcII (Virreira et al., 2006). Además, en esta región, que tiene una de las incidencias más altas de la enfermedad de Chagas en la actualidad, la mayoría de los pacientes cardíacos parecen presentar una enfermedad cardíaca leve y no progresan a una afección cardíaca grave en comparación con los pacientes infectados en el sureste de Brasil y el sur de Argentina (Yager et al., 2015). Al menos en parte, estas características específicas de la enfermedad de Chagas en la región del Gran Chaco están potencialmente asociadas con TcV, la UDT de *T. cruzi* prevalente en esta área. Curiosamente, esto también puede estar asociado con la creencia relativamente extendida en Bolivia de que si los pacientes infectados evitan el esfuerzo

físico innecesario y mantienen una vida pacífica, la enfermedad cardíaca de Chagas no es una enfermedad grave (Forsyth, 2017).

De manera similar, en un amplio estudio reciente realizado en Argentina, se identificó TcV en el 47,7% de la población infectada. Sin embargo, la probabilidad de encontrar TcV en pacientes que no han desarrollado la enfermedad después de 20 años de infección fue significativamente mayor que en pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (Bizai et al., 2020), lo que refuerza la idea de que TcV también está más asociado con enfermedades cardíacas más leves, al menos, en Argentina.

Pero, sin duda, la característica más intrigante del TcV es su potencial asociación con la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Chile, Bolivia, Paraguay, Uruguay y la región sur de Brasil. La frecuencia de infección congénita en todas estas áreas, donde predomina TcV, es mucho mayor, oscilando entre el 4% y el 6%, en comparación con casos relativamente raros, 1% o menos, en áreas donde circulan TcII y TcI (Luquetti et al., 2015). Se ha cuestionado si estas correlaciones son el resultado de las características biológicas intrínsecas de esta UDT, las cargas parasitaria o simplemente reflejan la abundancia local de estos linajes. Sin embargo, hasta ahora, los datos disponibles para investigar el impacto directo de las UDT en la transmisión congénita siguen siendo limitados (Bustos et al., 2019; Herrera et al., 2019; Hakim et al., 2023). Lamentablemente en nuestro estudio no existían pacientes asociados a la transmisión congénita de la enfermedad.

El linaje TcVI tiene una alta prevalencia en el sur de Argentina y representa el 66% de los casos identificados (Bizai et al., 2020). Es la principal causa de enfermedad cardíaca de Chagas grave en Argentina y la segunda causa en Brasil. Además, TcVI, junto con TcV, se ha asociado con la forma digestiva de la enfermedad en Argentina (Vicco et al., 2012). También hay evidencia de que esta UDT puede aumentar el riesgo de transmisión congénita de la enfermedad de Chagas (Bizai et al., 2020). Sin embargo, debido a los desafíos que enfrentan algunos grupos al diferenciar TcVI de TcII y TcV, aún no se comprende completamente la contribución precisa de esta UDT en la determinación de los aspectos clínicos de la enfermedad de Chagas. Los pacientes infectados con los linajes TcV o TcVI en nuestro estudio estaban relacionados uno con la forma cardíaca procedente de Colombia, 9 con la forma digestiva procedentes de Bolivia y Argentina y 6 relacionados con la forma indeterminada procedentes de Bolivia y Colombia.

El linaje TcII, junto con sus derivados relativamente más recientes, las UDTs híbridas TcV y TcVI, están inequívocamente asociados con los casos crónicos más graves de la enfermedad de Chagas y están muy extendidos en el centro, sur y sureste de América del Sur. Estas UDT están estrechamente relacionadas genéticamente y distinguirlas puede ser una tarea desafiante, dependiendo de la carga parasitaria y del método de genotipado empleado. Por lo tanto, a veces se hace referencia colectiva a TcII, TcV y TcVI como “no TcI” (García et al., 2017).

Este linaje (TcII) es el agente predominante de la enfermedad de Chagas en la región del Cono Sur de América del Sur, particularmente en áreas donde *Triatoma infestans* es o fue el principal vector doméstico. En estas regiones, TcII es responsable de más del 90% de las infecciones crónicas, manifestándose en formas cardíacas, cardiodigestivas o indeterminadas (Nielebock et al., 2020). En particular, esta UDT es la principal causa de casos graves de enfermedad de Chagas en América del Sur, especialmente en el centro y sureste de Brasil. En estas zonas, la prevalencia de pacientes con forma clínica cardíaca puede superar el 40% entre los pacientes en la fase crónica de la enfermedad (Hasslocher-Moreno et al., 2005; Lage-Silva et al., 2006; Nielebock et al., 2020). Esto contrasta con el promedio del 10 al 15% observado en otras áreas endémicas donde la TcII es rara o está ausente (Hasslocher-Moreno et al., 2005). En el sureste de Brasil, las lesiones tanto del tejido cardíaco como del digestivo están predominantemente asociadas con cepas TcII (Lage-Silva et al., 2006; Gomez-Ochoa et al., 2022). Además, la TcII se ha relacionado con la miocardiopatía chagásica crónica grave y con pacientes que experimentan insuficiencia cardíaca o paro cardíaco repentino en estas regiones (Freitas et al., 2005). En nuestro estudio se identificaron cuatro pacientes procedentes de Colombia con este linaje, uno de ellos con la EC digestiva y tres con la EC crónica indeterminada.

Por su parte los linajes TcIII y TcIV están asociados principalmente con el ciclo de transmisión selvático. Tienen una amplia distribución geográfica que abarca desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, con una prevalencia relativamente alta en la región del Amazonas. Sin embargo, determinar la distribución exacta y la filogeografía de TcIII y TcIV es un desafío debido a las limitaciones de varios métodos de genotipado utilizados en la literatura, que a menudo no pueden diferenciar entre estas UDT.

El TcIII rara vez se asocia con infecciones humanas y la mayoría de estos casos se han notificado en la región amazónica, a menudo vinculados a casos agudos. La primera evidencia clara de la asociación entre TcIII y la infección humana data de hace poco más de una década, durante una investigación de un brote agudo de enfermedad de Chagas en la Amazonia occidental brasileña (Monteiro et al., 2010). Sin embargo, esta posibilidad ya había sido sugerida, ya que se había detectado TcIII en perros domésticos en Paraguay y el norte de Brasil, así como en triatominos peridomésticos en el norte y sur de Brasil (Cardinal et al., 2008; Marcili et al., 2009; Cámara et al., 2010). Además, ya se habían notificado brotes de enfermedad de Chagas aguda causados tanto por TcI como por Z3 (TcIII o TcIV) (Valente et al., 2009). En relación a las infecciones crónicas, TcIII ha sido detectado en cinco pacientes infectados crónicos en Colombia que presentan miocardiopatía, pero en infección mixta con TcV (Ramírez et al., 2010). Otros autores (Gulh y Ramirez., 2013; Hernández et al., 2016), reportaron TcIII en el 1,6% (3 muestras) y el 1,5% (6 muestras) de las muestras estudiadas en cada uno de los estudios (236 y 400 muestras respectivamente). En nuestro estudio encontramos TcIII en un paciente con EC crónica cardíaca de Colombia y un paciente con EC crónica indeterminada de México.

Además de TcBat, TcIV sigue siendo una de las UDT menos caracterizadas. El TcIV rara vez se asocia con la enfermedad de Chagas humana fuera de la cuenca del Amazonas. Sin embargo, en la Amazonía brasileña occidental, esta UDT es responsable de la mayoría de las infecciones humanas agudas que ocurren en los brotes de la enfermedad de Chagas (Monteiro et al., 2012; de Freitas et al., 2023). En particular, TcIV fue responsable del primer supuesto brote registrado de casos agudos simultáneos de enfermedad de Chagas transmitidos por vía oral en Canudos, Belém, estado de Pará, Brasil (Miles et al., 1978). Posteriormente, se confirmaron varios casos de transmisión oral en la cuenca del Amazonas, que hoy en día se considera una zona endémica para esta forma de transmisión de la enfermedad de Chagas (Valente et al., 2009). Los casos reportados en nuestro estudio con TcIV estaban relacionados dos con la forma cardíaca procedentes de Colombia y Bolivia y dos relacionados con la forma indeterminada procedente de México y Colombia.

La alta prevalencia superpuesta de TcIV con TcIII y TcI en la región amazónica ha llevado a la hipótesis de que estas UDT están particularmente asociadas con casos agudos graves de enfermedad de Chagas causados por alimentos y bebidas contaminados. Además de los brotes agudos, también se ha detectado TcIV en humanos infectados crónicamente en Guatemala, Perú (Iwagami et al., 2007) y Venezuela (Miles et al., 2009; Carrasco et al., 2012). De hecho, diferentes estudios señalan que la TcIV es la causa secundaria de la enfermedad de Chagas en Venezuela (Miles et al., 2009; Carrasco et al., 2012). Por ejemplo, entre 95 aislamientos genotipados de casos de enfermedades humanas en Venezuela, el 79% pertenecía a TcI y el 21% a TcIV, siendo la mayoría de ellos casos agudos o asintomáticos (Carrasco et al., 2012).

Las infecciones mixtas y las re-infecciones por *T. cruzi* pueden alterar el curso natural de la infección en comparación con poblaciones individuales, otorgando al parásito nuevas propiedades y dificultando las correlaciones (Andrade et al., 2010, Rodríguez et al., 2010; Martins et al., 2008). En nuestro estudio las infecciones mixtas detectadas no se correlacionaron con las formas clínicas de la enfermedad, las 5 muestras clínicas detectadas correspondieron a pacientes con la EC crónica indeterminada, de ahí que no se pueda hacer ninguna asociación entre la presencia de las infecciones mixtas y las formas clínicas. Futuros estudios donde se incorporen un mayor número de muestras clínicas de diferentes formas clínicas y origen geográfico son necesarios para estudiar las implicaciones de las infecciones mixtas en la clínica de la EC.

El estudio de la diversidad genética de *T. cruzi* y su clasificación en UDT ha proporcionado información crucial sobre la ecoepidemiología y patogenicidad de este parásito. También ha arrojado luz sobre la compleja interacción entre el huésped y el patógeno y los factores genéticos que influyen en los resultados de las enfermedades. La intrincada red de variaciones genéticas dentro de las poblaciones de *T. cruzi* presenta desafíos formidables en la búsqueda de vacunas y terapias eficaces contra la enfermedad de Chagas (Zingales y Macedo, 2023).

Aún es difícil establecer una correlación entre la diversidad genética de *T. cruzi* y las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas. Aunque hubo cierto apoyo experimental para el tropismo tisular diferencial de las cepas de *T. cruzi* (Mantilla et al., 2010), otros informes no lograron vincular la genética del parásito con las formas clínicas de la enfermedad de Chagas (Macedo y Pena, 1998; Campbell et al., 2004; Gulh y Ramirez, 2013). Los aspectos genéticos de los parásitos pueden desempeñar un papel esencial a la hora de determinar qué tejidos del huésped se infectarán y, por tanto, influir en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, es importante realizar estudios que evalúen el comportamiento de diferentes aislados en coinfecciones (Ragone et al., 2012), considerando que esta interacción podría modificar el comportamiento intrínseco de los aislados individuales, cambiando el origen de la infección en la enfermedad de Chagas. También es necesario desarrollar herramientas capaces de acceder a la variabilidad genética y de expresión genética intragrupo (Silvestrini et al., 2024).

Los hallazgos aquí obtenidos promueven a la PCR-RFLP *hsp70* UDT como una valiosa herramienta de laboratorio para la distinción de UDT de *T. cruzi*. Esta técnica constituye una prueba de tipificación molecular práctica y económica para identificar la mayoría de las UDT de *T. cruzi*. Esto proporciona a la comunidad científica una prueba adicional específica, rápida y económica que puede mejorar la comprensión de la correlación entre la UDT de *T. cruzi* y la patología desarrollada durante la infección (Cura et al., 2015).

En un meta-análisis desarrollado por Velásquez-Ortiz y colaboradores (2022), al analizar los métodos moleculares utilizados para la identificación de las UDT de *T. cruzi* encontraron que los métodos basados en PCR han sido los más utilizados, seguidos de las metodologías electroforéticas y la secuenciación. Además, al analizar los algoritmos de genes o conjuntos de genes más comunes utilizados para la identificación y el genotipado del parásito, encontraron que la mayoría de los trabajos utiliza los genes 24S α + COII/SL-IR/cytb/GPI/18 S rRNA/A10/HSP60 seguido de 18 S + SL-IR/COII/A10/cytb/gGAPDH, kDNA maxi/minicircle, kDNA maxi/minicircle y finalmente kDNA maxi/minicircle + SL-IR/cytb/COII/GPI/1f8, en ese orden. Al relacionar los genes más comunes usados con el método de identificación/genotipado, se llegó a la conclusión que los métodos basados en PCR son los más utilizados para la mayoría de los genes, resultados que avalan la utilidad de la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UDT para la identificación de UDT de *T. cruzi* directamente a partir de muestras biológicas, método que permite la detección de infecciones mixtas, permite la detección de la mayoría de las UDTs de *T. cruzi* a partir de una sola amplificación del gen *hsp70* y dos digestiones subsiguientes. Futuros estudios, donde se aumenten las muestras a estudiar procedentes de las diferentes formas clínicas de EC, triatomíneos y reservorios, incluido Tcbat son necesarios con vistas a una mejor evaluación de la técnica propuesta.

CONCLUSIONES

1. Se demostró la utilidad de la PCR-RFLP *hsp70* UDT para la identificación de infecciones simples y mixtas de UDTs de *T. cruzi* en muestras de pacientes con Enfermedad de Chagas crónico de diferentes orígenes geográficos.
2. La PCR-RFLP *hsp70* UDT permite la detección directa en muestras clínicas de los principales linajes del parásito con un porcentaje de tipificación de alrededor del 50 %, por lo que se propone la aplicación de la misma por su bajo costo-efectividad en comparación con otros métodos de caracterización descritos anteriormente.
3. Corroboramos la dispersión geográfica de las UDTs y encontramos una asociación estadísticamente significativa entre el UDT TcI y la forma cardíaca y la UDT TcV o VI con la forma digestiva, en las muestras de pacientes analizados, contribuyendo a los estudios de conocer las posibles implicaciones de las UDTs del parásito en la determinación de las diversas manifestaciones clínicas de la enfermedad de Chagas.

RECOMENDACIONES

1. Evaluar la técnica de PCR-RFLP *hsp70* UTD en un mayor número de muestras clínicas, vectores y reservorios del parásito, incluido Tcbat.
2. Introducir el método PCR mini exón que permite la diferenciación de los linajes TcV y TcVI para de esta forma contar con un protocolo general que basado en dos blancos genéticos permita la diferenciación de todos los linajes de *T. cruzi*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abolis NG, Araújo SM, Toledo MJ, Fernández MA, Gomes ML. *Trypanosomacruzi* I-III in southern Brazil causing individual and mixed infections in humans, sylvatic reservoirs and triatomines. *Acta Trop*. 2011; 120(3):167-72.
- Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Ramírez JC, Cura CI, Tebar S, Fernández-Arévalo A, Pinazo MJ, de la Torre L, Posada E, Navarro F, Espinal P, Ballart C, Portús M, Gascón J, Schijman AG. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitol Int*. 2017 Apr;66(2):83-88.
- Andrade JP, Marin Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, et al. Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. *Arq Bras Cardiol*. 2011;96(6):434-42.
- Andrade LO, Andrews NW. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Oct;3(10):819-23.
- Andrade LO, Galvão LM, Meirelles Mde N, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Sep;105(6):834-7.
- Andrade SG, Campos RF, Sobral KS, Magalhães JB, Guedes RS, Guerreiro ML. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Jan-Feb;39(1):1-8.
- Angheben A, Buonfrate D, Cruciani M, Jackson Y, Alonso-Padilla J, Gascon J, et al. Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(5):e0007271.
- Antinori S, Galimberti L, Grande R, Ricaboni D, Sala S, Giacomet V, et al. Family cluster of Chagas disease among Bolivian immigrants in Italy: High rate of maternal-fetal transmission. *Travel Med Infect Dis*. 2022; 49: 102370.
- Arisue N, Hashimoto T, Yoshikawa H, Nakamura Y, Nakamura G, Nakamura F, et al. Phylogenetic position of *Blastocystis hominis* and of stramenopiles inferred from multiple molecular sequence data. *J. Eukaryot. Microbiol*. 2002a; 49:42-43.
- Arisue N, Sánchez LB, Weiss LM, Müller M, Hashimoto T. Mitochondrial-type hsp70 genes of the amitochondriate protists, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and two microsporidians. *Parasitol Int*. 2002b; 51:9-16
- Avila HA, Pereira JB, Thiemann O, De Paiva E, DeGrave W, Morel CM, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2421-6.
- Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48: 211-21.

- Balouz V, Bracco L, Ricci AD, Romer G, Agüero F, Buscaglia CA. Serological Approaches for *Trypanosoma cruzi* Strain Typing. Trends Parasitol. 2021 Mar;37(3):214-225.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. Lancet 2003; 362:1469-80.
- Basile L, Jansa JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. Euro Surveill. 2011; 16(37):19968.
- Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SC. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megasophagus. Int J Infect Dis. 2010; 14(11):e974-7.
- Besuschio SA, Picado A, Muñoz-Calderón A, Wehrendt DP, Fernández M, Benatar A, et al. *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. PLoS Negl Trop Dis. 2020 Aug 14; 14(8):e0008402.
- Bezerra CM, Cavalcanti LP, Souza Rde C, Barbosa SE, Xavier SC, Jansen AM, et al. Domestic, peridomestic and wild hosts in the transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Caatinga area colonized by *Triatoma brasiliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014; 109(7):887-98.
- Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS, et al. Follow-up of an asymptomatic Chagas disease population of children after treatment with nifurtimox (Lampit) in a sylvatic endemic transmission area of Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Feb 27;9(2):e0003465.
- Bittencourt AL, Sadigursky M, Barbosa HS. Doença de Chagas congênita. Estudo de 29 casos [Congenital Chagas' disease. Study of 29 cases]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1975;17(3):146-59.
- Bizai ML, Romina P, Antonela S, Olivera LV, Arias EE, Josefina DC, et al. Geographic distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes detected in chronic infected people from Argentina. Association with climatic variables and clinical manifestations of Chagas disease. Infect Genet Evol. 2020 Mar; 78:104128.
- Blum-Domínguez S, Espinoza B, Martínez-Martínez I, Maldonado-Velázquez G, Tamay-Segovia P. Hallazgo de infección con *Trypanosoma cruzi* sin evidencia serológica. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2011; 49(5):537-9.
- Bonney KM, Luthringer DJ, Kim SA, Garg NJ, Engman DM. Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. Annu Rev Pathol. 2019 Jan 24; 14:421-447.
- Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A, Diez C. Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. Infect Genet Evol. 2016; 43: 123–129.
- Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A, Diez C. Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. Infect Genet Evol. 2016; 43: 123–129.

- Bontempi IA, Bizai ML, Ortiz S, Manattini S, Fabbro D, Solari A, Diez C. Simple methodology to directly genotype *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in single and mixed infections from human blood samples. *Infect Genet Evol.* 2016 Sep;43: 123-9.
- Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, Brenière SF. *Trypanosoma cruzi*: study of the distribution of two widespread clonal genotypes in Bolivian *Triatoma infestans* vectors shows a high frequency of mixed infections. *Exp Parasitol.* 1996; 83: 275-82.
- Bosseno MF, Barnabé C, Magallón Gastélum E, Lozano Kasten F, Ramsey J, et al. Predominance of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2002, 40, 627–632.
- Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2010;10:337.
- Becker I, Miranda-Ortiz H, Fernández-Figueroa EA, Sánchez-Montes S, Colunga-Salas P, Grostieta E, et al. The Low Variability of Tc24 in *Trypanosoma cruzi* Tc1 as an Advantage for Chagas Disease Prophylaxis and Diagnosis in Mexico. *Pathogens.* 2023 Feb 23;12(3):368.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973; 27:347-82.
- Brener Z. Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. *Ann Soc Belg Med Trop* 1985; 65: 9-13.
- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1971; 13: 171-8.
- Brenière SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, Tibayrenc M, Noireau F. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in wild *Triatoma infestans* from Bolivia: predominance of Tc1. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(5):e1650.
- Brenière SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, et al. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: 179-84.
- Brenière SF, Lopez J, Vargas F, Barnabe C. Genetic variability and microdistribution of *Triatoma infestans* genotypes and *Trypanosoma cruzi* clones in Arequipa region (Peru). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997; 92: 401-8.
- Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into discrete typing units (UDTs): attempt at an inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10, e0004792.
- Brisse S, Verhoef J, Tibayrenc M. Characterisation of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. *Int J Parasitol.* 2001 Sep;31(11):1218-26.
- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, De Rissio AM, Cardoni RL. How to improve the early diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013; 7(10):e2476.

- Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012; 106(10):623-8.
- Burgos JM, Altcheh J, Bisio M, Duffy T, Valadares HM, Seidenstein ME, et al. Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas disease. *Int J Parasitol.* 2007 Oct; 37(12):1319-27
- Burgos JM, Begher S, Silva HM, Bisio M, Duffy T, Levin MJ, Macedo AM, Schijman AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Feb;78(2):294-7.
- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010 Sep 1;51(5):485-95.
- Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, et al. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 485–495.
- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol.* 2002 Nov;4(11):701-11.
- Burmeister, H., 1835. *Handbuch der Entomologie.* 2, Abt. I, ii + 400 + 4 pp., 2 est. (Schnabelkerfe, Rhyngota). Berlin.
- Bustamante JM, Craft JM, Crowe BD, Ketchie SA, Tarleton RL. New, combined, and reduced dosing treatment protocols cure *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Infect Dis* 2014; 209:150-62.
- Bustos PL, Mildubegger N, Volta BJ, Perrone AE, Laucella SA, Bua J. *Trypanosoma cruzi* Infection at the Maternal-Fetal Interface: Implications of Parasite Load in the Congenital Transmission and Challenges in the Diagnosis of Infected Newborns. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 1250.
- Calvopina M, Segovia G, Cevallos W, Vicuña Y, Costales JA, Guevara A. Fatal acute Chagas disease by *Trypanosoma cruzi* DTU TcI, Ecuador. *BMC Infect Dis.* 2020 Feb 14; 20(1):143.
- Calzada JE, Samudio F, de Juncá C, Pineda V, Burleigh BA, Saldaña A. Genetic Diversity of *Trypanosoma cruzi* in Panama Inferred by Multi-Locus Sequence Typing of Mitochondrial Genes. *Microorganisms* 2022, 10, 287.
- Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 2004 Sep;4(6):549-62.
- Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999; 94 Suppl 1:331-5.
- Candia-Puma MA, Machaca-Luque LY, Roque-Pumahuanca BM, Galdino AS, Giunchetti RC, Coelho EAF, Chávez-Fumagalli MA. Accuracy of Diagnostic Tests for the Detection of Chagas Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Diagnostics (Basel).* 2022 10; 12(11):2752.
- Carbajal-de-la-Fuente AL, Sánchez-Casaccia P, Piccinali RV, Provecho Y, Salvá L, Meli S, et al. Urban vectors of Chagas disease in the American continent: A systematic review of epidemiological surveys. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022; 16: e0011003.

- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol.* 2008 Nov; 38(13):1533-43.
- Carlier Y, Altcheh J, Angheben A, Freilij H, Luquetti AO, Schijman AG, et al. Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019; 13: e0007694.
- Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, Martínez C, et al. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* genotypes in Venezuela. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(6):e1707.
- Carrasco HJ, Segovia M, Llewellyn MS, Morocoima A, Urdaneta-Morales S, et al. Geographical Distribution of *Trypanosoma cruzi* Genotypes in Venezuela. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012, 6, e1707.
- Castillo-Castañeda A, Patiño LH, Muñoz M, Ayala MS, Segura M, Bautista J, Shaban MV, Paniz-Mondolfi A, Ramírez JD. Amplicon-based next-generation sequencing reveals the co-existence of multiple *Leishmanias* species in patients with visceral leishmaniasis. *Int J Infect Dis.* 2022;115:35-38.
- Cicora F, Ecurra V, Bibolini J, Petroni J, González I, Roberti J. Cerebral trypanosomiasis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2014; 16(5):813-7.
- Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variants in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol.* 1994; 66: 175-179.
- Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2014; 47(6):747-55.
- Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, Brouwer KC. A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. *Acta Trop.* 2016; 156: 68-78
- Corredor Arjona Augusto. Enfermedad de Chagas: 90 Años Después. *Rev. Salud pública.* 1999; 1(3): 242-244.
- Corrêa RR, Espínola HN. Descrição de *Triatoma pseudomaculata*, nova espécie de triatomíneo de Sobral. Ceará. *Arquivo de Higiene e Saúde Publica* 29: 115-127, 1964
- Cosentino RO, Agüero F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(7):e1777.
- Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007 Oct 30;102 Suppl 1:113-22.
- Cuba Cuba, CS. Revisión de los aspectos biológicos y diagnósticos del *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 1998; 31 (2).
- Cura C, Schijman AG. Relación entre los genotipos de *T. cruzi* y la presentación clínica de la enfermedad de Chagas. *Revista Española de Salud Pública.* 2013; 6: 9-16.

- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, et al. Multiplex Real-Time PCR Assay Using Taq Man Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9: e0003765.
- Chancey RJ, Edwards MS, Montgomery SP. Congenital Chagas Disease. Pediatr Rev. 2023; 44(4):213-221.
- Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Ortega-Pacheco A, Hernández-Cortazar IB, Cigarroa-Toledo N, Jiménez-Coello M. Combined use of real-time PCR and serological techniques for improved surveillance of chronic and acute American trypanosomiasis in dogs and their owners from an endemic rural area of Neotropical Mexico. Curr Res Parasitol Vector Borne Dis. 2022; 2:100081.
- Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. J Biomol Screen. 2015; 20(1):22-35.
- Chiaromonte MG, Frank FM, Furer GM, Taranto NJ, Margni RA, Malchiodi EL. Polymerase chain reaction reveals *Trypanosoma cruzi* infection suspected by serology in cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis patients. Acta Trop. 1999; 72(3):295-308.
- Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, Morris MI, et al. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. Am J Transplant. 2011; 11(4):672-80.
- D'Avila DA, Macedo AM, Valadares HM, Gontijo ED, de Castro AM, Machado CR, Chiari E, Galvão LM. Probing population dynamics of *Trypanosoma cruzi* during progression of the chronic phase in chagasic patients. J Clin Microbiol. 2009; 47: 1718–1725.
- da Silveira Pinto A, de Lana M, Britto C, Bastrenta B, Tibayrenc M. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. Int J Parasitol. 2000 Jun; 30(7):843-8.
- Dario MA, Andrade TES, Dos Santos CB, Fux B, Brandão AA, Falqueto A. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* samples derived from *Triatoma vitticeps* and *Panstrongylus geniculatus* of the Atlantic rainforest, southeast Brazil. Parasite. 2018; 25:59.
- de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. PLoS Pathog. 2006; 2: e24.
- de Freitas VLT, Piotto MR, Esper HR, Nakanishi EYS, Fonseca CdA, Assy JGPL, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcI and TcIV in Two Outbreaks of Orally-Transmitted Chagas Disease in the Northern Region of Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo 2023, 65, e7
- de Fuentes-Vicente JA, Gutiérrez-Cabrera AE, Flores-Villegas AL, Lowenberger C, Benelli G, Salazar-Schettino PM, Córdoba-Aguilar A. What makes an effective Chagas disease vector? Factors underlying *Trypanosoma cruzi*-triatomine interactions. Acta Trop. 2018; 183: 23-31.

- de Lana M, da Silveira Pinto A, Bastrenta B, Barnabé C, Noël S, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. *Exp Parasitol*. 2000 Oct;96(2):61-6.
- de Sousa AS, Vermeij D, Ramos AN Jr, Luquetti AO. Chagas disease. *Lancet*. 2024 Jan 13;403(10422):203-218. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01787-7.
- del Puerto R, Nishizawa JE, Kikuchi M, Iihoshi N, Roca Y, Avilas C, et al. Lineage analysis of circulating *Trypanosoma cruzi* parasites and their association with clinical forms of Chagas disease in Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 May 18;4(5):e687.
- Delgado La O' Jorge Pável, Montoto Concepción Daysi, Dean Álvarez Valia, Núñez Fernández Fidel Ángel, Mora González Salvador Roberto, Fraga Nodarse Jorge. Diagnóstico de tripanosomiasis americana en estudiantes de la Escuela Latinoamericana de Medicina. *Rev Cub Med Mil* 2016; 45: 119-130.
- Dias JCP. Natural history of Chagas' disease. *Arq Bras Cardiol* 1995; 65: 359–66.
- Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg* 1992; 46: 616-23.
- Diosque P, Tomasini N, Lauthier JJ, Messenger LA, Monje Rumi MM, Ragone PG, et al. Optimized multilocus sequence typing (MLST) scheme for *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3117.
- Dorn PL, McClure AG, Gallaspy MD, Waleckx E, Woods AS, Monroy MC, Stevens L. The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Sep 28;11(9):e0005878.
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favalaro RR, Freilij H, Schijman AG. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(4):e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e2000.
- Echeverría LE, Marcus R, Novick G, Sosa-Estani S, Ralston K, Zaidel EJ, et al. WHF IASC Road map on Chagas Disease. *Glob Heart*. 2020; 15: 26.
- Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, Streiger M, Sosa-Estani S. Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(11):e3312.
- Falla A, Herrera C, Fajardo A, Montilla M, Vallejo GA, Guhl F. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. *Acta Trop*. 2009 Apr;110(1):15-21.
- Ferreira RC, Briones MR. Phylogenetic evidence based on *Trypanosoma cruzi* nuclear gene sequences and information entropy suggest that inter-strain intragenic recombination is a basic mechanism underlying the allele diversity of hybrid strains. *Infect Genet Evol*. 2012 Jul; 12(5):1064-71.

- Ferrer E, Lares M, Viettri M, Medina M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas [Comparison between immunological and molecular techniques for the diagnosis of Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(5):277-82.
- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(3):125-131.
- Flores-Chavez MD, Abras A, Ballart C, Ibáñez Perez I, Perez-Gordillo P, Gállego M, Muñoz C, Moure Z, Sulleiro Igual E, Nieto J, García Diez E, Cruz I, Picado A. Evaluation of the Performance of the Loopamp *Trypanosoma cruzi* Detection Kit for the Diagnosis of Chagas Disease in an Area Where It Is Not Endemic, Spain. *J Clin Microbiol*. 2021 Apr 20;59(5):e01860-20.
- Flores-López CA, Machado CA. Analyses of 32 loci clarify phylogenetic relationships among *Trypanosoma cruzi* lineages and support a single hybridization prior to human contact. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Aug;5(8):e1272.
- Folgueira C, Requena JM. A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. *FEMS Microbiol Rev*. 2007; 31:359–377.
- Forsyth CJ. “I Cannot Be Worried”: Living with Chagas Disease in Tropical Bolivia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017, 11, e0005251.
- Fraga J, Fernández-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Deborggraeve S, Büscher P, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogenetic analysis of the *Trypanosoma* genus based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol*. 2016; 43: 165-72.
- Fraga J, Fernandez-Calienes A, Montalvo AM, Maes I, Dujardin JC, Van der Auwera G. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* using heat-shock protein 70 polymorphisms. *Trop Med Int Health*. 2014; 19: 195–206.
- Fraga J, Montalvo Álvarez AM, Van der Auwera G, Dujardin JC, Requena JM, Deborggraeve S, et al. Aportes a la evolución y clasificación taxonómica de los géneros de importancia médica de la familia Trypanosomatidae basado en el análisis filogenético del gen de la proteína de choque térmico 70. *Anales de la Academia de Ciencias de Cuba*, 2021, 11(1), e819.
- Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol*. 2010; 10: 238–245.
- Fraga J, Montalvo AM, Van der Auwera G, Maes I, Dujardin JC, Requena JM. Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect Genet Evol*. 2013; 18: 229–237.
- Fraga J, Veland N, Montalvo AM, Praet N, Boggild A, Valencia BM, et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the new world. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012; 74:142–150.
- Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Chatelain E, Kelly JM. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4653-61.

- Franco DJ, Vago AR, Chiari E, Meira FC, Galvão LM, Machado CR. *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp Parasitol*. 2003 May-Jun;104(1-2):54-61.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol* 2005; 35: 411–417.
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, et al. Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J Clin Microbiol*. 2007; 42:2294–2297
- Garcia, M.N.; Burroughs, H.; Gorchakov, R.; Gunter, S.M.; Dumonteil, E.; Murray, K.O.; Herrera, C.P. Molecular Identification and Genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in Autochthonous Chagas Disease Patients from Texas, USA. *Infect. Genet. Evol*. 2017, 49, 151–156.
- García-Huertas P, Cardona-Castro N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. *Biomed Pharmacother*. 2021;142:112020.
- Garzón EA, Barnabé C, Córdova X, Bowen C, Paredes W, Gómez E, Ouaiissi A, Tibayrenc M, Guevara AG. *Trypanosoma cruzi* isoenzyme variability in Ecuador: first observation of zymodeme III genotypes in chronic chagasic patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002 Jul-Aug;96(4):378-82.
- Giancola ML, Angheben A, Scorzolini L, Carrara S, Petrone A, Vulcano A, et al. Chagas Disease in the Non-Endemic Area of Rome, Italy: Ten Years of Experience and a Brief Overview. *Infect Dis Rep*. 2024 Jul 24;16(4):650-663.
- Gil J, Pavia P, Montilla M, Florez AC, Quintero C, Mercado M, et al. Comparison of a PCR test based on the histone H2A/SIRE genes with classical serological tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in Colombian patients. *Biomedica* 2007; 27: 83-91.
- Gómez-Ochoa SA, Rojas LZ, Echeverría LE, Muka T, Franco OH. Global, Regional, and National Trends of Chagas Disease from 1990 to 2019: Comprehensive Analysis of the Global Burden of Disease Study. *Glob Heart*. 2022; 24;17(1):59.
- Gonzalez-Sanz M, Crespillo-Andújar C, Chamorro-Tojeiro S, Monge-Maillo B, Perez-Molina JA, Norman FF. Chagas Disease in Europe. *Trop Med Infect Dis*. 2023 Dec 1;8(12):513.
- Guhl F, Auderheide A, Ramírez JD. From ancient to contemporary molecular eco-epidemiology of Chagas disease in the Americas. *Int J Parasitol*. 2014;44(9):605-12.
- Guhl F, Jaramillo C, Carranza JC, Vallejo GA. Molecular characterization and diagnosis of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli*. *Arch Med Res* 2002; 33: 362-70.
- Guhl F, Ramírez JD. Retrospective molecular integrated epidemiology of Chagas disease in Colombia. *Infect Genet Evol*. 2013 Dec;20:148-54.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 435-42.
- Gurevitz JM, Gaspé MS, Enriquez GF, Provecho YM, Kitron U, Gürtler RE. Intensified surveillance and insecticide-based control of the Chagas disease vector *Triatoma infestans* in the Argentinean Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013 Apr 11;7(4):e2158.

- Guyatt G, Oxman AD, Akl EA, Kunz R, Vist G, Brozek J, et al. GRADE guidelines: 1. Introduction-GRADE evidence profiles and summary of findings tables. *J Clin Epidemiol.* 2011;64(4):383-94.
- Hakim JMC, Waltmann A, Tinajeros F, Kharabora O, Machaca EM, Calderon M, et al. Amplicon Sequencing Reveals Complex Infection in Infants Congenitally Infected With *Trypanosoma cruzi* and Informs the Dynamics of Parasite Transmission. *J. Infect. Dis.* 2023, 228, 769–776.
- Hartl FU, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 2002; 295:1852–1858.
- Hasslocher-Moreno AM, Xavier SS, Saraiva RM, Sangenis LHC, de Holanda MT, Veloso HH, et al. Progression Rate from the Indeterminate form to the Cardiac form in Patients with Chronic Chagas Disease: Twenty-Two-Year Follow-Up in a Brazilian Urban Cohort. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2020, 5, 76.
- Hernández C, Salazar C, Brochero H, Teherán A, Buitrago LS, Vera M, et al. Untangling the transmission dynamics of primary and secondary vectors of *Trypanosoma cruzi* in Colombia: parasite infection, feeding sources and discrete typing units. *Parasit Vectors.* 2016 Dec 1;9(1):620.
- Hernandez Gonzalez, Yenin; Gonzalez Broche, Raúl. Review of the Triatominae subfamily (Hemiptera: Reduviidae) in Cuba .*Bol Mal Salud Amb [online]* 2006; 46:107-114.
- Herrera HM, Rademaker V, Abreu UG, D'Andrea PS, Jansen AM. Variables that modulate the spatial distribution of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma evansi* in the Brazilian Pantanal. *Acta Trop.* 2007 Apr;102(1):55-62.
- Herrera C, Truyens C, Dumonteil E, Alger J, Sosa-Estani S, Cafferata ML, et al. Phylogenetic Analysis of *Trypanosoma cruzi* from Pregnant Women and Newborns from Argentina, Honduras, and Mexico Suggests an Association of Parasite Haplotypes with Congenital Transmission of the Parasite. *J Mol Diagn.* 2019 Nov;21(6):1095-1105.
- Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct; 14(4):659-88.
- Higuera SL, Guhl F, Ramírez JD. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) through the implementation of a High-Resolution Melting (HRM) genotyping assay. *Parasites Vectors.* 2013; 6: 112.
- Hoare, C.A. *The Trypanosomes of Mammals.* Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972.
- Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 2014; 121(1):22-33.
- Hughes AL, Piontkivska H. Molecular phylogenetics of Trypanosomatidae: contrasting results from 18S-rRNA and protein phylogenies. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2003; 2,15.
- Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, et al. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2013. *Am J Transplant.* 2013;13(9):2418-25.

- Iglesias Rodríguez IM, Miura S, Maeda T, Imai K, Smith C, VasquezVelasquez C, Honda S, Hirayama K. Analysis of the Chagas disease situation in Japan: a cross-sectional study and cost-effectiveness analysis of a Chagas disease screening program. *Lancet Reg Health West Pac.* 2022;31:100574.
- Iglesias-Rus L, Boquete T, Romay-Barja M, Benito A, Jordan B, Blasco-Hernández T. Diagnostic pathways of Chagas disease in Spain: a qualitative study. *BMC Public Health.* 2023; 23: 332.
- Inga LAC, Olivera MJ. Reactivation of Chagas disease in a heart transplant patient infected by sylvatic *Trypanosoma cruzi* discrete typing unit I. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019 Jul 18;52:e20180512.
- Irish A, Whitman JD, Clark EH, Marcus R, Bern C. Updated Estimates and Mapping for Prevalence of Chagas Disease among Adults, United States. *Emerg Infect Dis.* 2023;28(7):1313-1320.
- Iwagami, M.; Higo, H.; Miura, S.; Yanagi, T.; Tada, I.; Kano, S.; Agatsuma, T. Molecular Phylogeny of *Trypanosoma cruzi* from Central America (Guatemala) and a Comparison with South American Strains. *Parasitol. Res.* 2007, 102, 129–134.
- Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):631.
- Izeta-Alberdi A, Ibarra-Cerdeña CN, Moo-Llanes DA, Ramsey JM. Geographical, landscape and host associations of *Trypanosoma cruzi* DTUs and lineages. *Parasit Vectors.* 2016 Dec 7;9(1):631.
- Izeta-Alberdi A, Pech-May A, Tun-Ku E, Mazariegos-Hidalgo CJ, López-Cancino SA, Gutiérrez S, et al. *Trypanosoma cruzi* in Mexican Neotropical vectors and mammals: wildlife, livestock, pets, and human population. *Salud Publica Mex.* 2023 Mar 10;65(2 mar-abr):114-126.
- Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2010;51(10):e69-75.
- Jaime LD, Aracely LM, Paulina OM, Dumonteil E, Barnabé C, Waleckx E, Hernández-Giles RG, Ramos-Ligonio A. Molecular Characterization of Four Mexican Isolates of *Trypanosoma cruzi* and Their Profile Susceptibility to Nifurtimox. *Acta Parasitol.* 2022 Dec;67(4):1584-1593.
- Jansen AM, Xavier SC, Roque AL. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. *Acta Trop.* 2015; 151:1-15.
- Jansen AM, Xavier SCDC, Roque ALR. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):502.
- Joselín DV, Ignacio M, Ángel RM, Gabriel GG, Rodrigo Isaias LV, Víctor SC, Jorge FN, et al. Multiple Discrete Typing Units of *Trypanosoma cruzi* Infect Sylvatic *Triatoma dimidiata* and *Panstrongylus rufotuberculatus* in Southeast Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 2021;105(4):1042-1049.
- Justi SA, Galvão C. The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends Parasitol* 2017; 33:42-52.

- Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci Data* 2014; 1: 140024.
- Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol* 1996; 34:1171-5.
- Kun H, Moore A, Mascola L, Steurer F, Lawrence G, Kubak B, et al. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis*. 2009;48(11):1534-40.
- La Hoz RM. Transplantation for chagas' disease: closing the knowledge gap. *Curr Opin Infect Dis*. 2022; 35(5):397-403.
- Lages-Silva E, Ramírez LE, Pedrosa AL, Crema E, da Cunha Galvão LM, Pena SD, Macedo AM, Chiari E. Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun;44(6):2167-71.
- Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. *Parasitology*. 2007; 134:339–350
- Lascano F, García Bournissen F, Altcheh J. Review of pharmacological options for the treatment of Chagas disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2022 Feb;88(2):383-402.
- Lauthier JJ, Tomasini N, Barnabé C, Rumi MM, D'Amato AM, Ragone PG, Yeo M, Lewis MD, Llewellyn MS, Basombrío MA, Miles MA, Tibayrenc M, Diosque P. Candidate targets for Multilocus Sequence Typing of *Trypanosoma cruzi*: validation using parasite stocks from the Chaco Region and a set of reference strains. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):350-8.
- Lescure FX, Le Loup G, Freilij H, Develoux M, Paris L, Brutus L, et al. Chagas disease: changes in knowledge and management. *Lancet Infect Dis* 2010; 10: 556-70.
- Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozool* 1980; 27:37-58.
- Lewis MD, Llewellyn MS, Gaunt MW, Yeo M, Carrasco HJ, Miles MA. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *Int J Parasitol*. 2009; 39: 1305–1317.
- Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. *J Exp Med*. 1990; 171:401-13.
- Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health*. 2019; 7: 166.
- Lilioso M, Folly-Ramos E, Rocha FL, Rabinovich J, Capdevielle-Dulac C, Harry M, et al. High *Triatoma brasiliensis* Densities and *Trypanosoma cruzi* Prevalence in Domestic and Peridomestic Habitats in the State of Rio Grande do Norte, Brazil: The Source for Chagas Disease Outbreaks? *Am J Trop Med Hyg*. 2017 Jun;96(6):1456-1459.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, Trejo-Varón JA, Carranza JC, Pinto M, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical

- analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop.* 2015; 151: 166–177.
- Lima-Oliveira TM, Fontes FVHM, Lilio M, Pires-Silva D, Teixeira MMG, Meza JGV, Harry M, et al. Molecular eco-epidemiology of sympatric Chagas disease vectors *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma petrochiae*: Ecotopes, genetic variation, natural infection prevalence by trypanosomatids and parasite genotyping. *Acta Trop.* 2020;201: 105188.
- Lindani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health.* 2019; 7: 166.
- Liu Q, Zhou XN. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect Dis Poverty.* 2015 28; 4: 60.
- López-García, A, Gilabert, JA. Oral transmission of Chagas disease from a One Health approach: A systematic review. *Trop Med Int Health.* 2023; 28: 689–698.
- Lucero RH, Brusés BL, Cura CI, Formichelli LB, Juiz N, Fernández GJ, et al. Chagas' disease in Aboriginal and Creole communities from the Gran Chaco Region of Argentina: Seroprevalence and molecular parasitological characterization. *Infect Genet Evol.* 2016 Jul;41:84-92.
- Luquetti AO, Tavares SB, Siriano Lda R, Oliveira RA, Campos DE, de Moraes CA, de Oliveira EC. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in central Brazil. A study of 1,211 individuals born to infected mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):369-76.
- Llewellyn MS, Miles MA, Carrasco HJ, Lewis MD, Yeo M, Vargas J, et al. Genome-Scale Multilocus Microsatellite Typing of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Unit I Reveals Phylogeographic Structure and Specific Genotypes Linked to Human Infection. *PLoS Pathog.* 2009, 5, e1000410.
- Llovera A, Abras A, Fernández-Arévalo A, Ballart C, Heras S, Muñoz C, Gállego M. Genetic Diversity of *Trypanosoma cruzi* in the United States of America: The Least Endemic Country for Chagas Disease. *Life (Basel).* 2024 Jul 19;14(7):901.
- Macedo AM, Pena SD. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today.* 1998 Mar;14(3):119-24.
- Machado-de-Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, Machado-Coelho GL, et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013; 108:873-80.
- Magalhães LMD, Gollob KJ, Zingales B, Dutra WO. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human-host interactions. *Lancet Microbe.* 2022 Sep;3(9):e711-e722.
- Majeau A, Murphy L, Herrera C, Dumonteil E. Assessing *Trypanosoma cruzi* Parasite Diversity through Comparative Genomics: Implications for Disease Epidemiology and Diagnostics. *Pathogens.* 2021 Feb 16;10(2):212.

- Mantilla JC, Zafra GA, Macedo AM, González CI. Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Hum Pathol*. 2010 Apr;41(4):610-3.
- Marcet PL, Duffy T, Cardinal MV, Burgos JM, Lauricella MA, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. PCR-based screening and lineage identification of *Trypanosoma cruzi* directly from faecal samples of triatomine bugs from northwestern Argentina. *Parasitology*. 2006 Jan;132(Pt 1):57-65.
- Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira AC, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009; 136:641–655.
- Martin DL, Postan M, Lucas P, Gress R, Tarleton RL. TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Eur J Immunol*. 2007 Oct;37(10):2764-71.
- Martín-Escolano J, Marín C, Rosales MJ, Tsaousis AD, Medina-Carmona E, Martín-Escolano R. An Updated View of the *Trypanosoma cruzi* Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. *Infectious Diseases* 2022. 9.
- Martínez I, Cervantes-Landín A, Espinoza B. Diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas [Molecular diagnosis of Chagas disease]. *Gac Med Mex*. 2013 May-Jun;149(3):363-5.
- Martinez-Perez A, Poveda C, Ramírez JD, Norman F, Gironés N, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M, López-Vélez R. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Trop*. 2016 May;157:145-50.
- Martins K, Andrade Cde M, Barbosa-Silva AN, do Nascimento GB, Chiari E, Galvão LM, da Câmara AC. *Trypanosomacruzi* III causing the indeterminate form of Chagas disease in a semi-arid region of Brazil. *Int J Infect Dis*. 2015; 39:68-75.
- Martins LP, Marcili A, Castanho RE, Therezo AL, de Oliveira JC, Suzuki RB, et al. Rural *Triatoma rubrovaria* from southern Brazil harbors *Trypanosoma cruzi* of lineage IIc. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Sep;79(3):427-34.
- Matthews S, Tannis A, Puchner KP, Bottazzi ME, Cafferata ML, Comandé D, Buekens P. Estimation of the morbidity and mortality of congenital Chagas disease: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Nov 7;16(11):e0010376.
- Messenger, L.A.; Llewellyn, M.S.; Bhattacharyya, T.; Franzén, O.; Lewis, M.D.; Ramírez, J.D.; Carrasco, H.J.; Andersson, B.; Miles, M.A. Multiple Mitochondrial Introgression Events and Heteroplasmy in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Maxicircle MLST and Next Generation Sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2012, 6, e1584.
- Miles MA, Cedillos RA, Póvoa MM, de Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*. 1981 Jun 20;1(8234):1338-40.
- Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel

- research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009 Oct; 136(12):1509-28
- Miles, M.A.; Souza, A.; Pova, M.; Shaw, J.J.; Lainson, R.; Toyé, P.J. Isozymic Heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the First Autochthonous Patients with Chagas' Disease in Amazonian Brazil. *Nature* 1978, 272, 819–821.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Sao Avilés A, Almirante B. Toxic Profile of Benznidazole in Patients with Chronic Chagas Disease: Risk Factors and Comparison of the Product from Two Different Manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59(10):6125-31.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Actualización en enfermedad de Chagas [Enferm Infecc Microbiol Clin. 2016;34(2):132-8.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014;371(10):966.
- Monje-Rumi MM, Brandán CP, Ragone PG, Tomasini N, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, et al. *Trypanosoma cruzi* diversity in the Gran Chaco: mixed infections and differential host distribution of TcV and TcVI. *Infect Genet Evol*. 2015 Jan;29:53-9.
- Monje-Rumi MM, Florida-Yapur N, Zago MP, Ragone PG, Pérez Brandán CM, Nuñez S, et al. Potential association of *Trypanosoma cruzi* DTUs TcV and TcVI with the digestive form of Chagas disease. *Infect Genet Evol*. 2020 Oct;84:104329.
- Montalvo AM, Fraga J, El Safi S, Gramiccia M, Jaffe CL, Dujardin JC, Van der Auwera G. Direct *Leishmania* species typing in Old World clinical samples: evaluation of 3 sensitive methods based on the heat-shock protein 70 gene. *Diag Microbiol Infect Dis*. 2014; 80 35–39.
- Montalvo AM, Fraga J, Maes I, Dujardin JC, van der Auwera G. Three new sensitive and specific heat shock protein 70 PCRs for global *Leishmania* species identification. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012, 31: 1453-61.
- Montalvo AM, Fraga J, Tirado D, Blandón G, Alba A, Van der Auwera G, Vélez ID, Muskus C. Detection and identification of *Leishmania* spp.: application of two hsp70-based PCR-RFLP protocols to clinical samples from the New World. *Parasitol Res*. 2017; 116(7):1843-1848.
- Montalvo-Ocototxtle IG, Rojas-Velasco G, Rodríguez-Morales O, Arce-Fonseca M, Baeza-Herrera LA, Arzate-Ramírez A, Meléndez-Ramírez G, Manzu-Sandoval D, Lara-Romero ML, Reyes-Ortega A, Espinosa-González P, and Palacios-Rosas E, *Journal of Clinical Medicine*, 27 (diciembre 2022).
- Monteiro, W.M.; Magalhães, L.K.; Santana Filho, F.S.; Borborema, M.; Silveira, H.; Barbosa, M.d.G.V. *Trypanosoma cruzi* TcIII/Z3 Genotype as Agent of an Outbreak of Chagas Disease in the Brazilian Western Amazonia. *Trop. Med. Int. Health* 2010, 15, 1049–1051.
- Monteiro, W.M.; Magalhães, L.K.C.; de Sá, A.R.N.; Gomes, M.L.; Toledo, M.J.d.O.; Borges, L.; Pires, I.; de Oliveira Guerra, J.A.; Silveira, H.; Barbosa, M.d.G.V. *Trypanosoma cruzi* IV Causing Outbreaks of Acute Chagas Disease and Infections by Different Haplotypes in the Western Brazilian Amazonia. *PLoS ONE* 2012, 7, e41284.

- Moo-Millan JI, Tu W, de Jesús Montalvo-Balam T, Ibarra-López MP, Hernández-Betancourt S, Jesús May-Concha I, et al. Presence of *Trypanosoma cruzi* TcI and *Trypanosoma dionisii* in sylvatic bats from Yucatan, Mexico. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2024 May 2:trae023.
- Morales ME, Campo Verde Arbocco F, Muñoz-San Martín C, Abba AM, Ríos TA, Cassini GH, Cattan PE, Jahn GA, Superina M. High *Trypanosoma cruzi* prevalence in armadillo (*Zaedyus pichiy*; Xenarthra: Chlamyphoridae) populations from Mendoza, Argentina. *Parasitol Res.* 2023 Jul;122(7):1593-1604.
- Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 2013 Jan;125(1):23-31.
- Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015;373(14):1295-306.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1477-82.
- Muñoz-San Martín C, Apt W, Zulantay I. Real-time PCR strategy for the identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units directly in chronically infected human blood. *Infect Genet Evol.* 2017; 49: 300–8.
- Muñoz-San Martín C, Zulantay I, Saavedra M, Fuentealba C, Muñoz G, Apt W. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* detected by real-time PCR in Chilean patients with chronic Chagas cardiomyopathy. *Acta Trop.* 2018 Sep;185:280-284.
- Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31 Suppl 1:26-34.
- Murillo-Godínez G. Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) *Med Int Méx*, 12 (2018)
- Murillo-Solano C, López-Domínguez J, Gongora R, Rojas-Gullosa A, Usme-Ciro J, Perdomo-Balaguera E, et al. Diversity and interactions among triatomine bugs, their blood feeding sources, gut microbiota and *Trypanosoma cruzi* in the Sierra Nevada de Santa Marta in Colombia. *Sci Rep.* 2021;11(1):12306.
- Murthy VK, Dibbern KM, Campbell DA. PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Mol Cell Probes* 1992; 6: 237-43.
- Navarro Martínez J, Keituqwa Yáñez I, Nicolás Franco S. Cardiac resynchronization therapy rapid reponse in a dilated cardiomyopathy due to Chagas disease. *Med Intensiva (Engl Ed).* 2022; 46(12):726-727.
- Neiva A. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de Triatoma. *Brazil-Médico* 1911; 25: 461-462.
- Nielebock MAP, Moreira OC, Xavier SCdC, Miranda LdFC, de Lima ACB, Pereira TdJS, et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and Chronic Chagas Disease Clinical Presentation and Outcome in an Urban Cohort in Brazil. *PLoS ONE* 2020, 15, e0243008
- Nute-Quiroz L, Moreno-Pérez PA. Emigrantes de Latinoamérica y enfermedad de Chagas; replantear la política de salud?. *Revista Dilemas Contemporáneos: Educación,*

- Política y Valores. <http://www.dilemascontemporaneoseducacionpoliticayvalores.com/Año: XII Número: 1 Artículo no.:63Período: 1 de septiembre al 31 de diciembre del 2024>.
- Ocaña-Mayorga S, Llewellyn MS, Costales JA, Miles MA, Grijalva MJ. Sex, Subdivision, and Domestic Dispersal of *Trypanosoma cruzi* Lineage I in Southern Ecuador. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010, 4, e915.
- Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia: Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *RevPanam Salud Publica.* 2020;44:e28.
- Ortiz S, Zulantay I, Apt W, Saavedra M, Solari A. Transferability of *Trypanosoma cruzi* from mixed human host infection to *Triatoma infestans* and from insects to axenic culture. *Parasitol Int.* 2015 Feb;64(1):33-6.
- Otálora-Luna F, Pérez-Sánchez AJ, Sandoval C, et al. Evolution of hematophagous habit in *Triatominae* (Heteroptera: Reduviidae). *Rev. Chil. de Hist. Nat.* 2015; 88:4.
- Paba J, Ricart CA, Fontes W, Santana JM, Teixeira AR, Marchese J, et al. Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* developmental stages using isotope-coded affinity tag reagents. *J Proteome Res.* 2004; 3:517-24.
- Pacheco L V, Santana LS, Barreto BC, Santos E De S, Meira CS. Oral transmission of Chagas disease: A literature review. *Research, Society and Development.* 2021; 10:(2): e31910212636.
- Panesso-Gómez S, Pavia P, Rodríguez-Mantilla IE, Lasso P, Orozco LA, Cuellar A, et al. *Trypanosoma cruzi* Detection in Colombian Patients with a Diagnosis of Esophageal Achalasia. *Am J Trop Med Hyg.* 2018 Mar;98(3):717-723.
- Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2013 Dec 19;19(1):34.
- Perez E, Monje M, Chang B, Buitrago R, Parrado R, Barnabé C, Noireau F, Brenière SF. Predominance of hybrid discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in domestic *Triatoma infestans* from the Bolivian Gran Chaco region. *Infect Genet Evol.* 2013 Jan;13:116-23.
- Pérez E, Monje M, Chang B, Buitrago R, Parrado R, Barnabé C, Noireau F, Brenière SF. Predominance of hybrid discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* in domestic *Triatoma infestans* from the Bolivian Gran Chaco region. *Infect Genet Evol.* 2013; 13:116-23.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet.* 2018; 391(10115):82-94.
- Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González MC, Zamora J, López-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 64(6):1139-47.
- Perez-Molina JA, Poveda C, Martinez-Perez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M, López-Velez R, Ramírez JD, Girones N. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol.* 2014 Jan; 21:440-2.
- Pinazo MJ, Guerrero L, Posada E, Rodríguez E, Soy D, Gascon J. Benznidazole-related adverse drug reactions and their relationship to serum drug concentrations in patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):390-5.

- Pinazo MJ, Thomas MC, Bustamante J, Almeida IC, Lopez MC, Gascon J. Biomarkers of therapeutic responses in chronic Chagas disease: state of the art and future perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110: 422-32.
- Pinto A, Pett S, Jackson Y. Identifying Chagas disease in Australia: an emerging challenge for general practitioners. *Aust Fam Physician*. 2014;43(7):440-2.
- Pinto AY, Ferreira AG, Jr., Valente Vda C, Harada GS, Valente SA. Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. *Rev Panam Salud Publica* 2009; 25: 77-83.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007 Sep;103(3):195-200.
- Prescilla-Ledezma A, Blandon R, Schijman AG, Benatar A, Saldaña A, Osuna A. Correction: Mixed infections by different *Trypanosoma cruzi* discrete typing units among Chagas disease patients in an endemic community in Panama. *PLoS One*. 2021 Apr 8;16(4):e0250184.
- Ragone PG, Pérez Brandán C, Padilla AM, Monje Rumi M, Lauthier JJ, Alberti D'Amato AM, et al. Biological behavior of different *Trypanosoma cruzi* isolates circulating in an endemic area for Chagas disease in the Gran Chaco region of Argentina. *Acta Trop*. 2012 Sep;123(3):196-201.
- Ramírez JD, Tapia-Calle G, Muñoz-Cruz G, Poveda C, Rendón LM, Hincapié E, Guhl F. *Trypanosome* species in neo-tropical bats: biological, evolutionary and epidemiological implications. *Infect Genet Evol*. 2014;22:250-6.
- Ramos LG, de Souza KR, Júnior PAS, Câmara CC, Castelo-Branco FS, Boechat N, Carvalho SA. Tackling the challenges of human Chagas disease: A comprehensive review of treatment strategies in the chronic phase and emerging therapeutic approaches. *Acta Trop*. 2024 Aug; 256:107264.
- Rangel-Gamboa L, González-Martínez EI, Sánchez-Cruz LC, Montiel-Rangel AI, Martínez-Hernández F. *Trypanosoma cruzi* DTU II coinfection with bacteria producing prolonged cutaneous lesion in a healthy young male. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2023 Mar 13;65:e15.
- Rangel-Gamboa L, López-García L, Moreno-Sánchez F, Hoyo-Ulloa I, Vega-Mémije ME, Mendoza-Bazán N, et al. *Trypanosoma cruzi* infection associated with atypical clinical manifestation during the acute phase of the Chagas disease. *Parasit Vectors*. 2019 Oct 30;12(1):506.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375(9723):1388-402.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012; 26: 275-91.
- Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Lopez MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 51: 271-80.

- Requena JM, Lopez MC, Jimenez-Ruiz A, de la Torre JC, Alonso C.A head-to tail tandem organization of *hsp70* genes in *Trypanosoma cruzi*. Nucleic Acids Res. 1988; 16:1393–1406.
- Riarte A, Luna C, Sabatiello R, Sinagra A, Schiavelli R, De Rissio A, et al. Chagas' disease in patients with kidney transplants: 7 years of experience 1989-1996. Clin Infect Dis. 1999;29(3):561-7.
- Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, Chang S, Pecoul B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(7):e484.
- Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(3):412-6.
- Rincón-Acevedo CY, Parada-García AS, Olivera MJ, Torres-Torres F, Zuleta-Dueñas LP, Hernández C, Ramírez JD. Clinical and Epidemiological Characterization of Acute Chagas Disease in Casanare, Eastern Colombia, 2012-2020. Front Med (Lausanne). 2021 Jul 23;8:681635.
- Rodrigues E, Santos G, Da Silva M, Barros J, Bernaldo A, Diniz R, et al. Chagas immunochromatographic rapid tests in the serological diagnosis of *trypanosoma cruzi* in wild and domestic canids. 2022; 10.3389/fcimb.2022.835383
- Rodriguez JB, Falcone BN, Szajnman SH. Detection and treatment of *Trypanosoma cruzi*: a patent review (2011-2015). Expert Opin Ther Pat. 2016 Sep;26(9):993-1015.
- Roman F, das Chagas Xavier S, Messenger LA, Pavan MG, Miles MA, Jansen AM, Yeo M. Dissecting the Phyloepidemiology of *Trypanosoma cruzi* I (TcI) in Brazil by the Use of High Resolution Genetic Markers. PLoS Negl. Trop. Dis. 2018, 12, e0006466.
- Rozas M, De Doncker S, Adauí V, Coronado X, Barnabe C, Tibyarenc M, Solari A, Dujardin, JC. Multilocus polymerase chain reaction restriction fragment– length polymorphism genotyping of *Trypanosoma cruzi* (Chagas disease): taxonomic and clinical applications. J Infect Dis. 2007; 195: 1381–1388.
- Ruiz A, Pelayo L, Chávez A, Alberti E, Núñez FA, Sarracent J. Estudio seroepidemiológico de la Enfermedad de Chagas en estudiantes de la Escuela Latinoamericana de Medicina. Rev Panam Infectol 2010; 12:13-16.
- Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Castillo J, Araya E, Martínez G, Rodríguez J. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of *Triatoma infestans* used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. Parasit Vectors. 2016 Jul 4;9(1):382.
- Sales-Campos H, Kappel HB, Andrade CP, Lima TP, Mattos ME Jr, de Castilho A, Correia D, Giraldo LE, Lages-Silva E. A DTU-dependent blood parasitism and a DTU-independent tissue parasitism during mixed infection of *Trypanosoma cruzi* in immunosuppressed mice. Parasitol Res. 2014 Jan;113(1):375-85.
- Salvador R, Aridgides D, Pereira Perri M. Parasite-derived neurotrophic factor/trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* links neurotrophic signaling to cardiac innate immune response. Infect Immun 2014; 82:3687-96.

- Salvatella R, Irabedra P, Castellanos LG. Interruption of vector transmission by native vectors and "the art of the possible". *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(1):122-5.
- Samuels AM, Clark EH, Galdos-Cardenas G, Wiegand RE, Ferrufino L, Menacho S, et al. Epidemiology of and impact of insecticide spraying on Chagas disease in communities in the Bolivian Chaco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(8):e2358.
- Sanchez L, Messenger LA, Bhattacharyya T, Gilman RH, Mayta H, Colanzi R, et al. Congenital Chagas disease in Santa Cruz Department, Bolivia, is dominated by *Trypanosoma cruzi* lineage V. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2022;116(1):80-84.
- Sanchez L, Messenger LA, Bhattacharyya T, Gilman RH, Mayta H, Colanzi R, Bozo R, Verástegui M, Miles MA, Bern C. Congenital Chagas disease in Santa Cruz Department, Bolivia, is dominated by *Trypanosoma cruzi* lineage V. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2022 Jan 19;116(1):80-84.
- Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and non endemicity. *J Clin Microbiol*. 2014;52(7):2506-12.
- Sangenito LS, Branquinha MH, Santos ALS. Funding for Chagas Disease: A 10-Year (2009-2018) Survey. *Trop Med Infect Dis*. 2020;5(2):88.
- Saraiva RM, Mediano MFF, Mendes FSNS, da Silva GMS, Velosos HH, Sangenis LHC, da Silva PS, Mazzoli-Rocha F, Sousa AS, Holanda MT, and Hasslocher-Moreno AM, *World Journal of Cardiology*, 23 (diciembre 2021).
- Schijman AG, Alonso-Padilla J, Longhi SA, Picado A. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2022;117: e200444.
- Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*. 2003; 52(3):441-9.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e931.
- Serra MA, Cardoso M, Serra M. Prevalencia de enfermedad de Chagas en estudiantes de medicina de 16 países latinoamericanos de la Escuela Salvador Allende, Cuba. *Medwave* 2012; 12.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):845-52.
- Shikanai-Yasuda MA, Sátolo CG, Carvalho NB, Atala MM, Ferrufino RQ, Leite RM, et al. Interdisciplinary approach at the primary health care level for Bolivian immigrants with Chagas disease in the city of São Paulo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(3):e0005466.
- Silva TRM, Rios TG, do Nascimento Ramos CA, Scofield A, Lima TARF, Alves LC, Ramos RAN, de Carvalho GA. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs of the triatomine species in a Chagas disease endemic area. *J Parasit Dis*. 2022;46(1):64-71.

- Silvestrini MMA, Alessio GD, Frias BED, Sales Júnior PA, Araújo MSS, Silvestrini CMA, et al. New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. *Front Immunol*. 2024 Apr 9;15:1342431.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 2006; 22, 168–174.
- Solari A, Ortíz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, Salinas P, Rojas A, Schenone H. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2001 Oct;48(4):515-9.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1996; 83: 141-152.
- Souto RP, Vargas N, Zingales B. *Trypanosoma rangeli*: discrimination from *Trypanosoma cruzi* based on a variable domain from the large subunit ribosomal RNA gene. *Exp Parasitol* 1999; 91: 306-14.
- Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 62: 45-52.
- Stål C. Enumeratio Reduviinorum Americae. In: Enumeratio Hemipterorum. 2. Kungliga Svenska Vetenskaps Akademien Handlingar. 1872;10(4): 1-159.
- Stål C. Monographie der Gattung Conorhinus und Verwandten. *Berl. Ent. Zeitschr*. 1859, 3, 99–117.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol* 2001; 1: 143–150.
- Stevens, J.R., Gibson, W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol. Today*. 1999; 15: 432–437.
- Streiger ML, del Barco ML, Fabbro DL, Arias ED, Amicone NA. Estudio longitudinal e quimioterapia específica em crianças, comdoença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2004; 37(5):365-75.
- Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989; 33: 205-214.
- Suárez C, Nordel D, García-Mingo A, Moore D, and Chiodini P. Diagnosis and Clinical Management of Chagas Disease: An Increasing Challenge in Non-Endemic Areas Research and Reports in Tropical Medicine, 16 (julio 202).
- Sulaiman IM, Morgan UM, Thompson RC, Lal AA, Xiao L. Phylogenetic relationships of *Cryptosporidium* parasites based on the 70-kilodalton heat shock protein (HSP70) gene. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66:2385–2391
- Tavares de Oliveira M, Sulleiro E, Silgado Gimenez A, de Lana M, Zingales B, Santana da Silva J, Marin-Neto JA, Molina I. Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Jun 4;14(6):e0008311.

- Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, de Souza W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6: e1749.
- Thakare R, Dasgupta A, Chopra S. Update on nifurtimox for treatment of Chagas disease. Drugs Today (Barc). 2021; 57(4):251-263.
- Tibayrenc M. Modelling the transmission of *Trypanosoma cruzi*: The need for an integrated genetic epidemiological and population genomics approach. En: Modelling parasite transmission and control. Eds. Michael E & Spear RC. 2010. pp. 200-211. Springer-Verlag Berlin, Berlin.
- Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Filho OA, Tibayrenc M, Barnabé C, Tafuri WL, de Lana M. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrob Agents Chemother. 2003 Jan;47(1):223-30.
- Torhorst CW, White ZS, Bhosale CR, Beatty NL, Wisely SM. Identification of the parasite, *Trypanosoma cruzi*, in multiple tissues of epidemiological significance in the Virginia opossum (*Didelphis virginiana*): Implications for environmental and vertical transmission routes. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16(12):e0010974.
- Torres CR, Valdez PMC, Días MJL. Es la Enfermedad de Chagas un peligro para Cuba. Imbiomed. 2011; 15-1.
- Torres-Martínez DS, Quimbaya-Ramírez JJ, Monroy-Díaz ÁL. Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas congénito: Aspectos relevantes. Revista Médica de Risaralda, 2023; 29(1), 127-146.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol 2001; 31: 472-81.
- Urbano P, Hernández C, Velásquez-Ortiz N, Ballesteros N, Páez-Triana L, Vega L, et al. Transmission ecology of *Trypanosoma cruzi* by *Rhodnius prolixus* (Reduviidae: Triatominae) infesting palm-tree species in the Colombian Orinoco, indicates risks to human populations. PLoS Negl Trop Dis. 2024 Feb 20;18(2):e0011981.
- Valdés P. Clasificación Guandlach de hemipteros cibanos, conforme a los ejemplares que existen en el Museo del Instituto de Segunda Enseñanza de La Habana. An Acad Cienc Med Fis Nat La Habana Rev Cient 1910; 425-46.
- Valente, S.A.d.S.; da Costa Valente, V.; das Neves Pinto, A.Y.; de Jesus Barbosa César, M.; dos Santos, M.P.; Miranda, C.O.S.; Cuervo, P.; Fernandes, O. Analysis of an Acute Chagas Disease Outbreak in the Brazilian Amazon: Human Cases, Triatomines, Reservoir Mammals and Parasites. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2009, 103, 291–297.
- Vallejo GA, Guhl F, Carranza JC, Moreno J, Triana O, Grisard EC. Parity between kinetoplast DNA and mini-exon gene sequences supports either clonal evolution or speciation in *Trypanosoma rangeli* strains isolated from *Rhodnius colombiensis*, *R. pallens* and *R. prolixus* in Colombia. Infect Genet Evol 2003; 3: 39-45.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. Acta Trop 2009; 110: 137-47.

- Veland N, Boggild AK, Valencia C, Valencia BM, Llanos-Cuentas A, Van der Auwera G, Dujardin JC, Arevalo J. *Leishmania (Viannia)* species identification on clinical samples from cutaneous leishmaniasis patients in Peru: assessment of a molecular stepwise approach. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:495–498.
- Velásquez-Ortiz N, Hernández C, Cantillo-Barraza O, Ballesteros N, Cruz-Saavedra L, Herrera G, et al. *Trypanosoma cruzi* Parasite Burdens of Several Triatomine Species in Colombia. *Trop Med Infect Dis.* 2022 Dec 19;7(12):445.
- Vicco MH, Bontempi I, Ortiz S, Solari A, Bottasso OA, Marcipar I. Chronic Chagas Disease with Cardiodigestive Involvement and the TcVI Infective form of *Trypanosoma cruzi*. A Case Report. *Parasitol. Int.* 2012, 61, 735–737.
- Vickerman K. The Diversity of the Kinetoplastid Flagellates. In: Lumsden, W.H.R., Evans, D.A. (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, London/New York/San Francisco, 1976. pp. 1–34.
- Villa LM; Guhl F, Zabala D, Ramírez JD, Urrea DA, Hernández DC, et al. The Identification of Two *Trypanosoma cruzi* I Genotypes from Domestic and Sylvatic Transmission Cycles in Colombia Based on a Single Polymerase Chain Reaction Amplification of the Spliced-Leader Intergenic Region. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2013, 108, 932–935.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006; 144(10):724-34.
- Virreira, M.; Serrano, G.; Maldonado, L.; Svoboda, M. *Trypanosoma cruzi*: Typing of Genotype (Sub) Lineages in Megacolon Samples from Bolivian Patients. *Acta Trop.* 2006, 100, 252–255.
- Vivas RJ, García JE, Guhl F, Hernández C, Velásquez N, Ramírez JD, Carranza JC, Vallejo GA. Systematic review on the biology, ecology, genetic diversity and parasite transmission potential of *Panstrongylus geniculatus* (Latreille 1811) in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2021;116:e200528.
- Votýpka J, d'Avila-Levy CM, Grellier P, Maslov DA, Lukeš J, Yurchenko V. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re)description. *Trends Parasitol* 2015; 31:460–469.
- Westenberger SJ, Barnabé C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics.* 2005; 171: 527–543.
- Wirth M, Gálvez RI, Jochum J, Strauss R, Kristensen K, Stich A, et al. Knowledge, attitudes, behaviors, and serological status related to Chagas disease among Latin American migrants in Germany: A cross-sectional study in six German cities. *Front Cell Infect Microbiol.* 2023; 12: 1047281.
- World-Health-Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Available at: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acceso 19 de Abril de 2024.

- Yager JE, Lozano Beltran DF, Torrico F, Gilman RH, Bern,C. Prevalence of Chagas Heart Disease in a Region Endemic for *Trypanosoma cruzi*: Evidence From a Central Bolivian Community. *Glob. Heart* 2015, 10, 145.
- Yamagata Y, Nakagawa J. Control of Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2006; 61:129–65.
- Yamasaki M, Tajima M, Lee KW, Jeong JR, Yamato O, Maede Y. Molecular cloning and phylogenetic analysis of *Babesia gibsoni* heat shock protein 70. *Vet Parasitol.* 2002; 11: 123–129.
- Yeo M, Mauricio IL, Messenger LA, Lewis MD, Llewellyn MS, Acosta N, et al. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Jun;5(6):e1049.
- Zafra G, Mantilla JC, Valadares HM, Macedo AM, González CI. Evidence of *Trypanosoma cruzi* II infection in Colombian chagasic patients. *Parasitol Res.* 2008 Aug;103(3):731-4.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 1051-4.
- Zingales B, Bartholomeu DC. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2022; 117: e210193.
- Zingales B, Macedo AM. Fifteen Years after the Definition of *Trypanosoma cruzi* DTUs: What Have We Learned? *Life (Basel).* 2023 Dec 14;13(12):2339.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 240-53.
- Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop.* 2018; 184: 38–52.
- Zulantay I, Muñoz G, Liempi D, Rozas T, Manneschi MJ, Muñoz-San Martín C, Botto-Mahan C, Apt W, Cabrera G. Discrete Typing Units of *Trypanosoma cruzi* Identified by Real-Time PCR in Peripheral Blood and Dejections of *Triatoma infestans* Used in Xenodiagnosis Descriptive Study. *Pathogens.* 2022 Jul 12;11(7):787.