

Introducción de la técnica de la RCP ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK.



Tesis presentada en opción al grado científico de Máster en Parasitología

Autor: Dr. Jorge Pável Delgado La O´
Especialista de 1^{er} grado en Administración de Salud
Especialista de 1^{er} grado en Microbiología
Profesor Asistente

Tutor: Lic. Jorge Fraga Nodarse. DrC
Profesor Auxiliar. Investigador Titular

Dedicatoria:

A mi hijo, a mi esposa, a mis padres, a mi hermano, a Tía nena.

Agradecimientos:

Llevar a término cualquier trabajo lleva en si los agradecimientos, pues con el único esfuerzo del autor no se podría finalizar la obra, ya que a lo largo de su realización deben enfrentarse dificultades varias; de forma tal que requiere la estimulación, orientación y energías de otras personas. De ahí que una omisión involuntaria me sería imperdonable.

A Fraga, profesor y compañero de las batallas y la rosa blanca, por enseñarme a cultivar como maestro indispensable, de su "general" y amigo sincero.

Para los que permitieron y promovieron mi superación, animaron, aceptaron y posibilitaron que llegara hasta aquí.

A Dora Ginorio, por la fe en su alumno y la parasitología.

Los que me brindaron sus ideas constituyendo ejemplos en mi desarrollo profesional, siendo tan amables en transmitir sus experiencias de eterna utilidad y a quienes entrego mi admiración y respeto por su consagración, sencillez y modestia, por saber escuchar y guardarme un espacio en sus paciencias.

Para mis amigos y hermanos por el estímulo constante y apoyo incondicional en todo momento.

Para todos aquellos de quienes recibí los esfuerzos y ayuda inestimables, cuentan para siempre con mi cariño y agradecimientos más profundos.

RESUMEN

El diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas (EC) mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimersa (RCP) es útil para la detección de casos en la fase aguda, en la infección congénita, en pacientes inmunodeprimidos, cuando los resultados de la serología no son concluyentes, en la detección de parásitos en sangre de pacientes seronegativos y en el monitoreo de la detección temprana del fracaso al tratamiento, siendo aún controversial para la detección de los casos en fase crónica. Todo esto demuestra la necesidad de contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (LNRP-IPK) con herramientas moleculares que permitan, junto a las herramientas serológicas, contar con un algoritmo que sea capaz de detectar con mayor validez y seguridad diagnóstica la Enfermedad de Chagas. En este estudio se introdujo y evaluó en el LNRP-IPK la técnica de la RCP que amplifica una región del ADNk utilizando los juegos de cebadores S35-S36. Además se evaluó la potencialidades de la técnica en la diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*. Se normalizó la técnica de la RCP ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de *T. cruzi*. La RCP mostró alta sensibilidad analítica para los seis linajes del parásito, así como una buena especificidad con resultados satisfactorios de repetibilidad y reproducibilidad. La técnica permite diferenciar entre las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli*, no obstante dado que la sensibilidad analítica para *T. rangeli* fue baja, no se recomienda para su detección y diferenciación a partir de muestras clínicas. Finalmente, se concluye que la RCP ADNk (S35-S36) puede ser utilizada para la detección de *T. cruzi* en el LNRP-IPK a partir de muestras clínicas.

INDICE

SECCIÓN	Pág.
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OJETIVOS	7
2.1. Objetivo general	7
2.2. Objetivos específicos	7
3. REVISION BIBLIOGRÁFICA	8
3.1. Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	8
3.2. Características morfológicas de los estadios de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	11
3.2.1. Epimastigote.	11
3.2.2. Tripomastigote.	11
3.2.3. Amastigote.	11
3.3. Ciclo de vida.	12
3.3.1. Vectores de la Enfermedad de Chagas.	12
3.3.2. Ciclo de vida.	14
3.3.3. Características de las poblaciones parasitarias.	16
3.3.4. Formas de transmisión.	18
3.4. Epidemiología	19
3.5. Fases, formas y evolución clínica.	21
3.6. Diagnóstico	23
3.6.1. Examen microscópico	24
3.6.2. Aislamiento del agente	24
3.6.3. Métodos serológicos	25
3.6.4. Diagnóstico molecular	26
3.7. Tratamiento	28
3.8. Control de la Enfermedad de Chagas.	30
3.9. Situación de la Enfermedad de Chagas en Cuba.	31
4. MATERIALES Y MÉTODOS	32
4.1 Tipo de estudio	32
4.2 Universo de trabajo	32
4.2.1 Cepas de referencia <i>Trypanosoma spp.</i>	32
4.2.2 Muestras de ADN de otros agentes infecciosos	34
4.2.3 Muestras clínicas humanas	34

4.3 Normalización de la RCP ADNk (S35-S36)	35
4.4 Análisis de parámetros analíticos de la RCP ADNk (S35-S36)	37
4.4.1 Sensibilidad analítica de la RCP ADNk (S35-S36)	37
4.4.2 Especificidad analítica de la RCP ADNk (S35-S36)	37
4.4.3 Repetibilidad de la RCP ADNk (S35-S36)	37
4.4.4 Reproducibilidad de la RCP ADNk (S35-S36)	38
4.5 Evaluación de la utilidad de la RCP ADNk (S35-S36)	38
4.5.1 Validez y seguridad diagnóstica de la RCP ADNk (S35-S36)	38
4.6. Consideraciones éticas	39
5. RESULTADOS	41
5.1. Normalización de la técnica de RCP ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de <i>T. cruzi</i> .	41
5.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas de la técnica, así como la repetibilidad y reproducibilidad.	43
5.3. Evaluar la potencialidad de la técnica para la diferenciación de <i>T. cruzi</i> y <i>T. rangeli</i> .	47
5.4. Evaluar la utilidad de la RCP ADNk en la detección de <i>T. cruzi</i> a partir de sangre periférica en un grupo de pacientes estudiados.	48
6. DISCUSIÓN	51
7. CONCLUSIONES	59
8. RECOMENDACIONES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXOS	80

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana constituye uno de los más importantes problemas de salud pública en Centroamérica y Suramérica. Es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las 13 Enfermedades Tropicales Olvidadas. En común con otras EC es un indicador de pobreza y desventaja: afecta a poblaciones con poca visibilidad y poca voz política, causa estigma y discriminación, es relativamente descuidada por los investigadores, y tiene un impacto considerable en la morbilidad y la mortalidad, constituyen un azote a la humanidad desde la antigüedad y continúa siendo un problema económico y social en muchos países de América Latina (Hotez *et al.*, 2008; Moncayo *et al.*, 2009; WHO, 2010). Alrededor de 6 millones de personas se encuentran infectadas en 21 países endémicos de la región de América Latina, provoca, en promedio, alrededor de 14.000 muertes al año. Se presenta, una incidencia anual de 30.000 casos vectoriales y 9.000 recién nacidos infectados durante el embarazo, así como 70 millones de personas se encuentran en riesgo de adquirir la enfermedad (Bern *et al.*, 2007; Rassi *et al.*, 2010; Liu y Zhou, 2015; WHO, 2017). Hoy la situación epidemiológica se complica con la entrada de inmigrantes procedentes de los países endémicos a países de Europa, el Pacífico occidental, Estados Unidos y Canadá, donde esta entidad se ha convertido en un problema de salud importante, al observarse un número creciente de individuos infectados (Schmunis, 2007; Guerri-Guttenberget *et al.*, 2008; Bern y Montgomery, 2009; Gascon *et al.*, 2010; Liu y Zhou, 2015).

Esta parasitosis es causada por el protozoo *T. cruzi* perteneciente al Orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae por presentar un flagelo y un organelo con ADN muy condensado llamado kinetoplasto. Se encuentra dentro del subgénero *Schizotrypanum* por tener un kinetoplasto voluminoso y multiplicarse intracelularmente dentro de sus huéspedes vertebrados. Pertenece a la Sección *Stercoraria* ya que la forma infectante es transmitida por las heces del insecto vector (Paes y Rayol, 1996).

El análisis genético poblacional de *T. cruzi* demuestra que el mismo presenta una estructura clonal con diversidad genética y fenotípica (Tibayrenc *et al.*, 1986). Esto se refiere a un modelo con ausencia o limitada recombinación genética con persistencia de asociaciones multilocus duradera y cualquier mecanismo citológico de

reproducción (Tibayrenc, 2010). Se han descrito seis linajes genéticos distintivos (DTU del inglés *Discrete Typing Unit*) (Tybairnc, 1998; Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000). Los que han sido validados por un comité de expertos y nombrados TcI al TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Recientemente se ha incluido un nuevo DTU denominado Tcbat (Lima *et al.*, 2015; Zingales, 2017).

El ciclo de vida de *T. cruzi* requiere normalmente de dos hospederos: un insecto 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). El hospedero invertebrado lo constituyen insectos hematófagos pertenecientes al orden Hemíptera, familia Reduviidae, subfamilia *Triatominae* (Brener, 1985).

La principal forma de transmisión de la enfermedad humana la constituye la forma vectorial (80 % de las diferentes vías de transmisión) (PAHO 2009; WHO, 2017). Otras formas son a través de la transfusión de sangre y la vía congénita, las que constituyen causas principales de infección en áreas urbanas y en países no endémicos (Liu y Zhou, 2015). Más recientemente, se ha descrito la que ocurren por la vía oral, debido a la ingestión de alimentos contaminados con las heces y orina del vector, reportándose diferentes brotes agudos de la enfermedad en Brasil, Venezuela y Colombia (Rueda *et al.*, 2014; Liu y Zhou, 2015). Otros mecanismos, menos comunes, involucran accidentes de laboratorio, manejo de animales infectados, transplante de órganos y por la leche materna (Pereira y Navarro, 2013; Liu y Zhou, 2015). Una vía teóricamente posible, pero extremadamente rara es la transmisión sexual (Moncayo y Ortiz Yanine 2006).

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. Seguidamente los pacientes pasan a una fase 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 (Rassi *et al.*, 2010). Entre el 30 al 40 % de pacientes finalmente desarrollan la forma determinante de la fase crónica caracterizada por una forma cardiaca, digestiva (megaesófago y megacolon) o cardiodigestiva entre 10 a 30 años después de iniciada la infección provocando la muerte del paciente (Dias, 1995).

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). En la fase aguda de EC el diagnóstico de laboratorio se basa en pruebas parasitológicas directas como el examen de sangre fresca, frotis y gota gruesa donde se pueden observar los parásitos. La prueba directa es más sensible que el frotis coloreado y debe ser el método de elección de la fase aguda. Si estas pruebas fueran negativas, se deben usar métodos de concentración microhematócrito o *Strout* que presentan de 80 a 90% de positividad y son recomendadas en el caso de fuerte sospecha de EC aguda y negatividad de la prueba directa con sangre fresca (Lescure *et al.*, 2010).

En la fase crónica de la enfermedad, indeterminada o determinada, el diagnóstico parasitológico directo resulta comprometido por la baja parasitemia (de Freitas *et al.*, 2011). Los métodos parasitológicos indirectos (xenodiagnóstico o hemocultivo) que pueden ser utilizados, presentan baja sensibilidad (de 20 a 50%). De esta forma, en la fase crónica es esencialmente serológico siendo las técnicas más comunes el ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA), la inmunoflorescencia indirecta (IFI) y la hemaglutinación indirecta (HAI) (Gomes *et al.*, 2009). Este diagnóstico debe ser realizado utilizando dos pruebas serológicas de principios metodológicos diferentes. La Organización Panamericana de la Salud (OPS)/OMS recomienda considerar positivos a aquellos individuos que tienen dos pruebas serológicas positivas (Bern *et al.*, 2007; Apt *et al.*, 2008).

El diagnóstico serológico presenta algunas limitantes por ejemplo, no es útil en los casos sospechosos de recién nacidos con sospecha de Chagas congénito, 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 *et al.*, 1999).

Trypanosoma rangeli constituye otro parásito del género *Trypanosoma* no patógeno para el hospedero vertebrado (incluyendo humano) que infecta además de humanos animales domésticos y salvajes en América Central y del Sur (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 la enfermedad de Chagas, 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).

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, la necesidad de establecer un criterio de cura (Sguassero *et al.*, 2015), y de detectar la existencia de pacientes seronegativos con EC (Batista *et al.*, 2010; Blum-Dominguez *et al.*, 2011) explican el interés y la necesidad de implementación de 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 ha sido probada en la investigación de *T. cruzi*, directamente en la sangre de pacientes crónicos, es el ensayo molecular por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), 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 la enfermedad de Chagas, 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; Diaz *et al.*, 1992; Kirchhoff *et al.*, 1996), los miniexones (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 la RCP es la de los minicírculos del kinetoplasto (Virreira *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2011).

El genoma mitocondrial de *T. cruzi* está constituido por el ADN del kinetoplasto, representa cerca de 20 % del ADN celular total. Está organizado en una estructura en red, en la cual millares de pequeñas moléculas circulares, los minicírculos, se encuentran concatenadas representando 95 % del contenido de ADNk de la célula. Esas moléculas presentan características que las tornan en blancos ideales para la detección por la RCP, tomando que se encuentran presentes en un elevado número de copias (entre 10 000 a 30 000 en dependencia del linaje) por red, más allá de que cada minicírculo contiene cuatro regiones de secuencias altamente conservadas y cuatro altamente variables presentes en todas las cepas y aislados representativos de los diferentes linajes del *T. cruzi*. Dentro de esta región se han diseñado juegos de cebadores para la región constante y para la región variable, obteniéndose mejores resultados de sensibilidad con los cebadores diseñados para la región variable entre los que se encuentran los cebadores 121-122 (Degrave *et al.*, 1988; Windker *et al.*, 1994; Britto *et al.*, 1995) y S35-S36 (Sturm *et al.*, 1988; Ávila *et al.*, 1991; 1994). Este juego de cebadores ha sido utilizado en el diagnóstico de *T. cruzi* y *T. rangeli* y adicionalmente permite la diferenciación entre ambos parásitos presentándose patrones de bandas de amplificación que pueden ser distinguidos entre ambos parásitos, lo que le confiere una importancia adicional a este método (Vargas *et al.*, 2000). Sin embargo, la capacidad de estos cebadores de detectar los diferentes linajes de *T. cruzi*, así como la sensibilidad analítica a *T. rangeli* no se ha verificado hasta el momento.

De forma general, los procedimientos de la RCP han mostrado valores variables de sensibilidad y especificidad dependiendo de un grupo de factores técnicos tales como: volumen de la muestra colectada, las condiciones y conservación de la muestra, el método utilizado para la extracción del ADN, la secuencia del parásito y los cebadores seleccionados, los reactivos usados así como las condiciones en el termociclador. La variabilidad de la sensibilidad de la RCP también se ha explicado en parte por la presencia intermitente y cantidad de parásitos circulantes en el momento en que se colecta la muestra de sangre (Schijman *et al.*, 2011).

El amplio debate existente sobre el tema, hace necesario continuar los estudios de evaluación de técnicas de RCP así como la comparación de diferentes ensayos, con vistas a determinar el método con mejor valor de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de EC, sobre todo en la fase crónica.

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. De todo lo anterior se deduce la necesidad de contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” con herramientas moleculares que permitan, junto a las herramientas serológicas, complementar el algoritmo establecido para el diagnóstico de EC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Introducir y evaluar la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK.

2.2. Objetivos específicos

1. Normalizar la técnica de la RCP ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de *T. cruzi*.
2. Determinar la sensibilidad y especificidad analíticas de la técnica, así como la repetibilidad y reproducibilidad.
3. Evaluar la potencialidad de la técnica para la diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*.
4. Evaluar la utilidad de la RCP ADNk en la detección de *T. cruzi* a partir de sangre periférica en un grupo de pacientes estudiados.

3. REVISION BIBLIOGRÁFICA

3.1. Clasificación taxonómica de *Trypanosoma cruzi*.

El agente causal de la enfermedad de Chagas es *Trypanosoma cruzi* cuya ubicación sistemática es la siguiente (Levine *et al.*, 1980):

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Sub-phylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Suborden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: Trypanosoma

Subgénero: Schizotrypanum

Especie: cruzi (Chagas, 1909)

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes, por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de EC, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño en el hombre y *T. brucei brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*, que causan la enfermedad en animales.

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 infestan mamíferos se separaron en dos secciones: Salivaria y Stercoraria. Los tripanosomas de la sección Salivaria se subdividieron en cuatro subgéneros: Trypanozoon, Duttonella, Nannomonas y Pycnomonas. El subgénero Stercoraria comprendía 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 el gliceraldehido 3-fosfato dehidrogenasa glicosomal (gGAPDH) (Simpson *et al.*, 2006; Stevens, 2008; Stevens y Gibson, 1999; Stevens y Rambaut, 2001). A pesar de la información proporcionada por el análisis de secuencia 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) 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), el estudio combinado con otros marcadores genéticos. Este estudio apoyó la clasificación de las especies de *Trypanosoma* en clados en lugar de en secciones y subgéneros. Se reconocieron nueve clados: *Trypanosoma carassi*, *Trypanosoma congolense*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma grayi*, *Trypanosoma lewisi*, *T. rangeli*, *T. theileri*, *Trypanosoma vivax* y *Trypanozoon* (Figura 1). Estos resultados resultaron consistentes con el conocimiento existente de la filogenia del género.

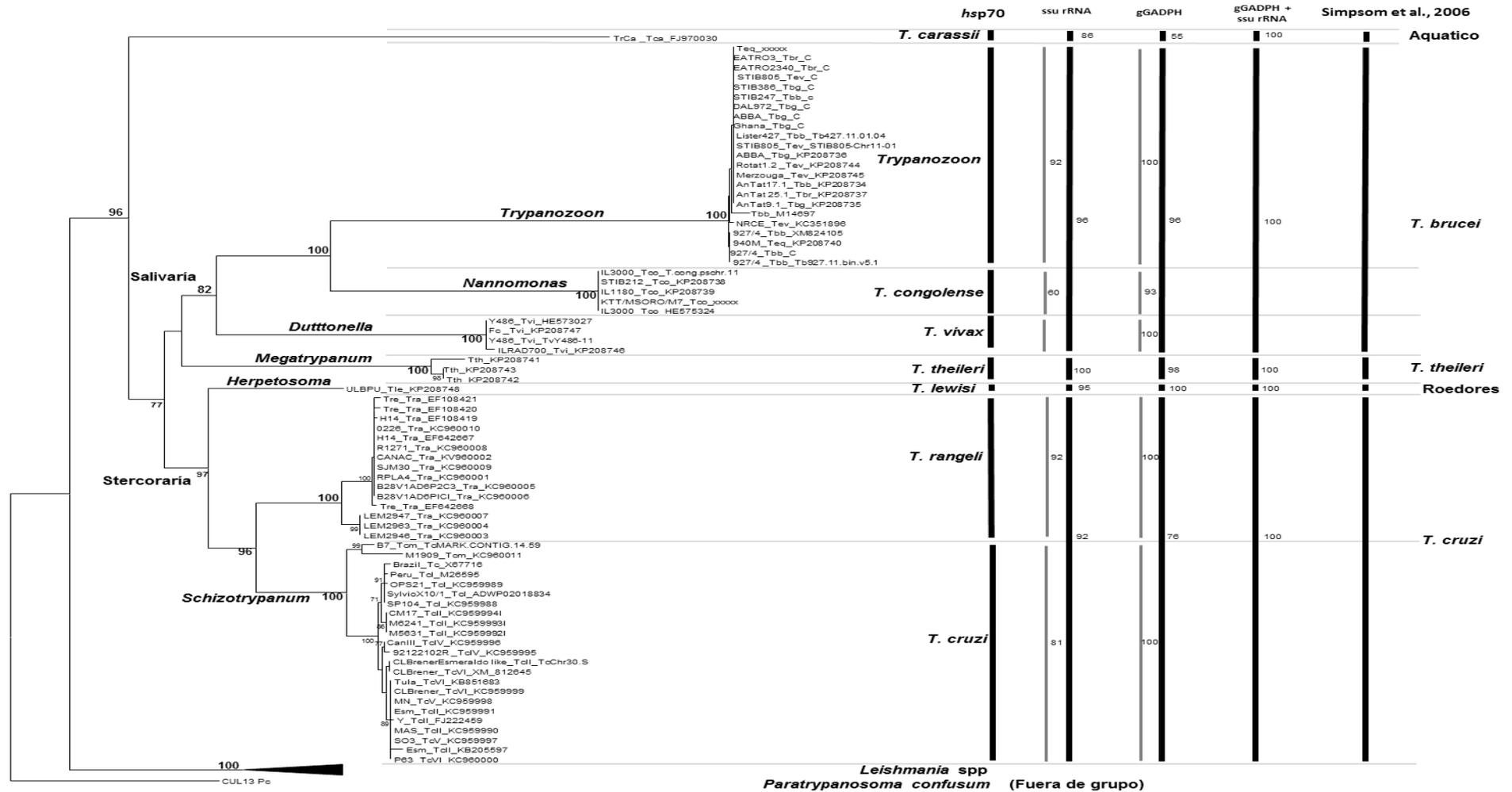


Figura 1. Filogenia de unión al vecino de las secuencias de nucleótidos *hsp70* que pertenecen a 11 especies de *Trypanosoma*. Las distancias se estimaron utilizando el modelo Kimura de 2 parámetros. Bootstrap se infirió a partir de 2000 repeticiones, y se da en porcentajes en los entrenudos cuando excede el 70% (primer valor). Para comparación, también los valores de arranque de los árboles de máxima parsimonia y máxima verosimilitud se muestran para cada grupo respectivo (segundo y tercer valor, respectivamente). El árbol se enraizó con las secuencias de *Paratrypanosoma confusum* y *Leishmania* spp. (*L. aethiopica*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. garnhami*, *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. lainsoni*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. naiffi*). Los nombres en las ramas representan el clasificación subgénero clásica de Hoare (1972). Las secciones de Stercoraria y Salivaria están indicadas a la izquierda. 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); gGAPDH (Hamilton *et al.*, 2004); y SSUrDNA + gGAPDH (Lima *et al.*, 2013).

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

T. cruzi presenta tres estadios distinguibles fácilmente por microscopía de campo claro según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brener, 1973). A continuación los describimos brevemente.

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 2A).

3.2.2. Tripomastigote.

Es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospederos (Figura 2B 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 estadio 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 μm), que se localiza intracelularmente en vacuolas acídicas y que es replicativa en el citoplasma del mamífero hospedero (Ley *et al.*, 1990) (Figura 2C).

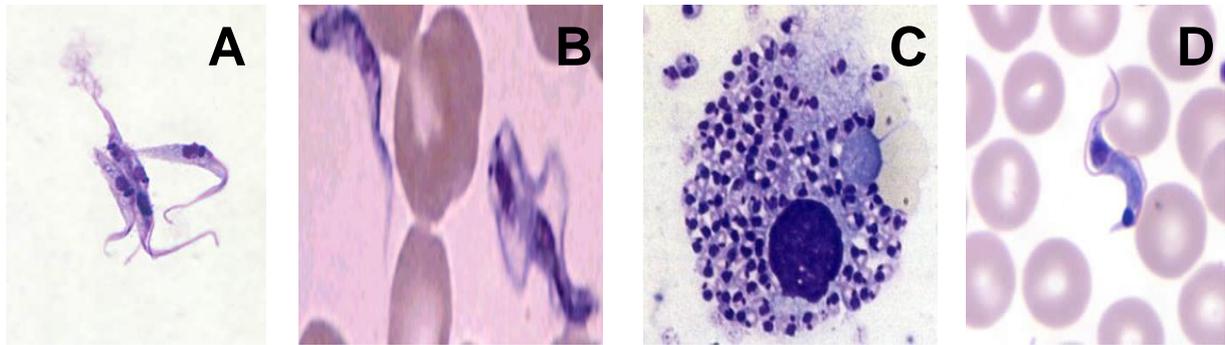


Figura 2. Estadios del ciclo de vida de *T. cruzi*. A) Epimastigotes, B) Tripomastigote metacíclico, C) Amastigotes en el interior de una célula muscular, D) Tripomastigote sanguíneo en sangre periférica.

3.3. Ciclo de vida.

El ciclo de vida de *T. cruzi* requiere normalmente de dos hospederos: un insecto 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).

3.3.1. Vectores de la Enfermedad de Chagas.

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 (Anexo 1) (Justi y Galvão, 2017).

Las dos tribus de *Triatominaes* más estudiadas, *Triatomini* y *Rhodniini*, son comprensiblemente las más abundantes ("más fáciles de encontrar") y también las más diversas ("especies más descritas"). Se ha demostrado que ambas tribus son monofiléticas construido en base a la morfología, antes que los datos de secuencia de ADN estuvieran disponibles, sin embargo, los nuevos datos filogenéticos basados en ADN 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 triatomíneos presentan hábitat 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). Los principales vectores domésticos en los países endémicos son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, *T. dimidiata*, *R. ecuadoriensis*, *T. maculata*, *T. brasiliensis*, *Pastrongylus megistus*, *P. geniculatus*, *R. neglectus*, *R. stali*, *T. nasutus* y *T. sordida* (Aguilar *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2007; Gulh *et al.*, 2007; Ponce *et al.*, 2007; Zeledón *et al.*, 2007) (Figura 3). La mayoría de las especies asociadas a la transmisión de *T. cruzi*, varían según sus características propias y su localización en diferentes regiones. Así, *T. infestans* predomina en los países del cono sur, mientras *R. prolixus* se encuentra estrechamente ligado a áreas de Centroamérica con alta presencia de flora autóctona como el árbol de la Palma, por lo que se conserva en el ciclo enzootico. Este insecto presenta los dos sexos y tiene cinco estadios ninfales, los que participan en su totalidad en la transmisión de *T. cruzi*.

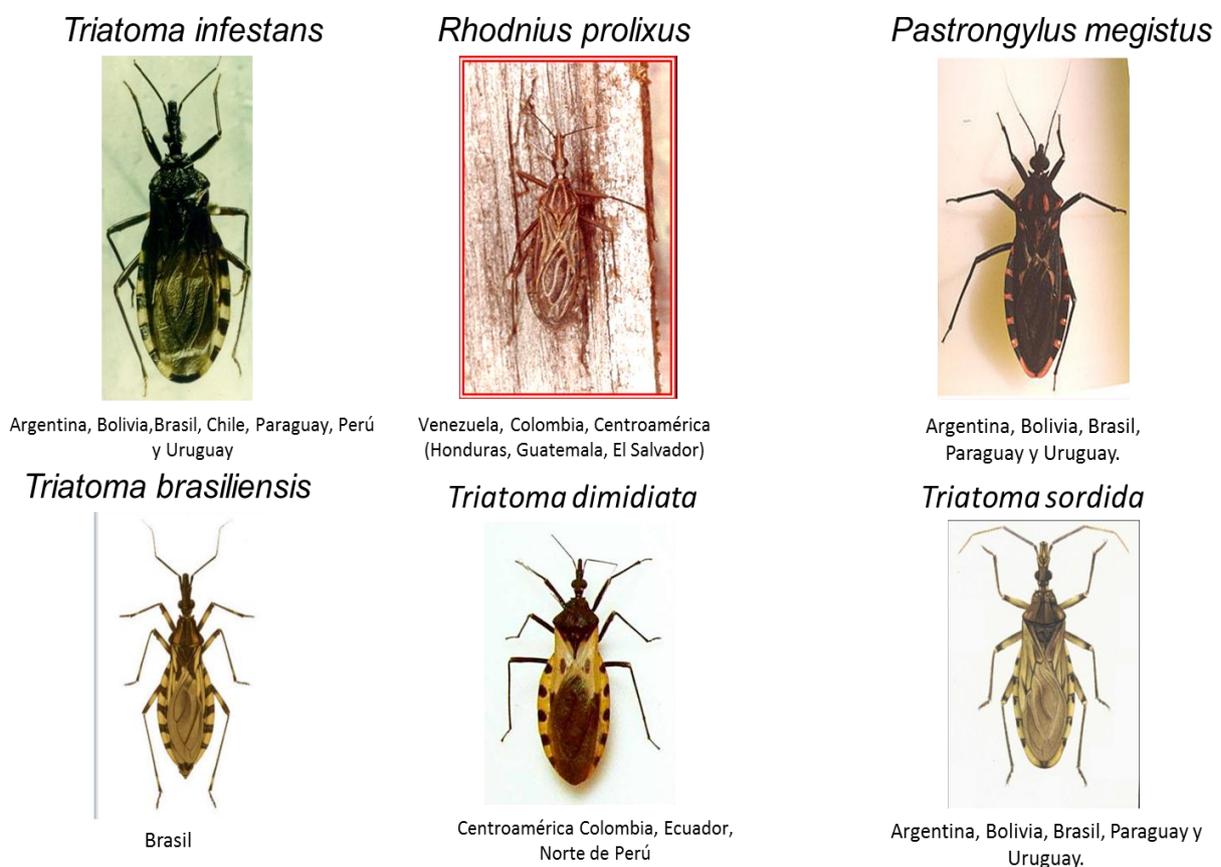


Figura 3. Principales vectores de la Enfermedad de Chagas y su distribución en los países de la Región de las Américas.

3.3.2. Ciclo de vida.

Este ciclo comienza cuando el insecto vector 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). 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). 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 (Brener, 1971; Tyler y Engman, 2001; Rassi *et al.*, 2009) (Figura 4).

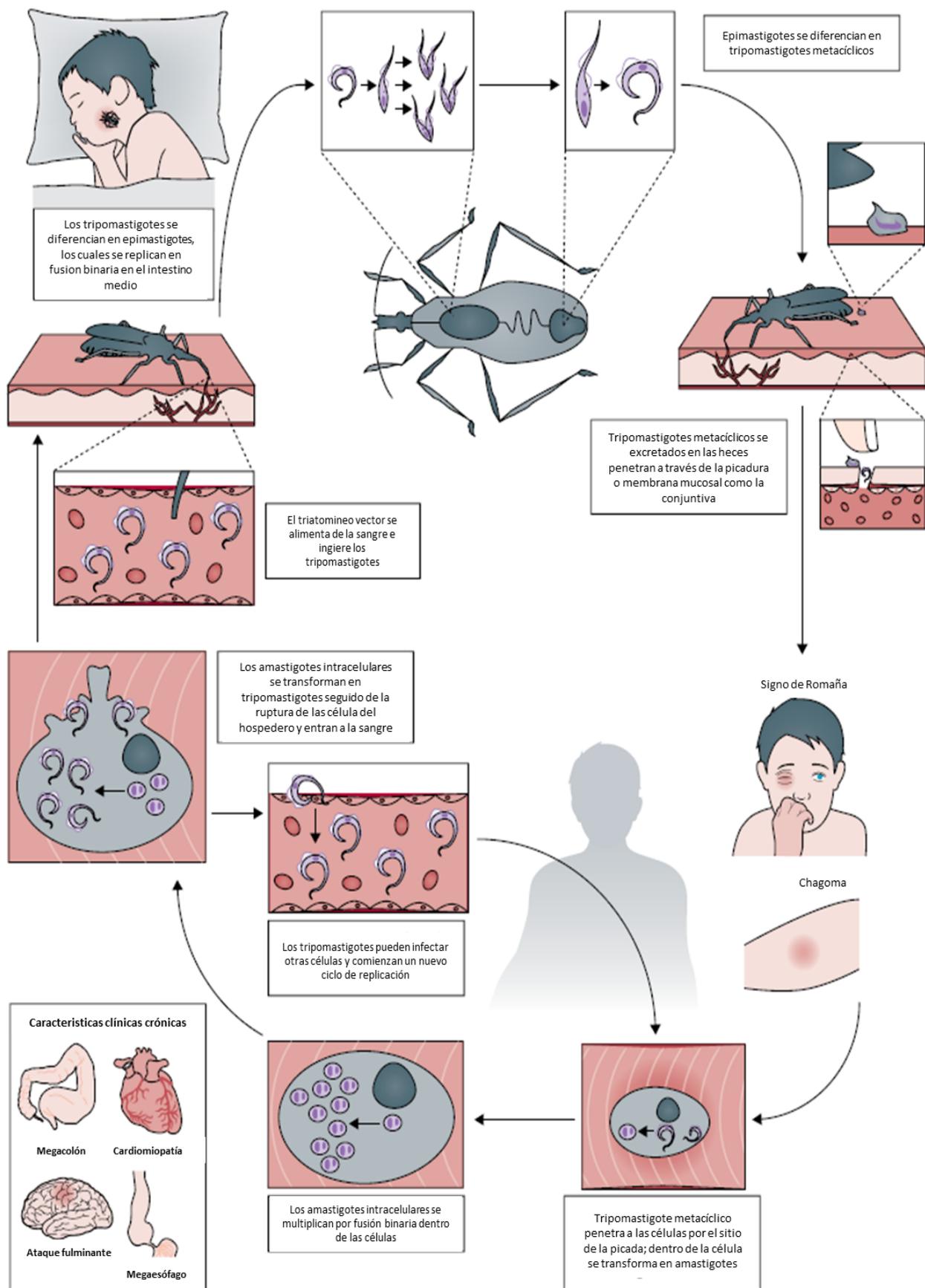


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de Pérez-Molina y Molina, 2018.

3.3.3. Características de las poblaciones parasitarias.

Trypanosoma cruzi se compone de una amplia variedad de poblaciones circulantes en insectos vectores, animales vertebrados que actúan como reservorios del parásito y en el hombre. Esta amplia diversidad podría implicar características biológicas distintivas entre las poblaciones estudiadas, las cuales incluirían efectos patológicos, inmunológicos, vulnerabilidad a fármacos y otras características de importancia médica (Dvorak, 1984; Ayala, 1993). Esto ha motivado la generación de diversas líneas de investigación sobre sus propiedades biológicas, que incluye curvas de parasitemia, respuesta inmune, sensibilidad a fármacos y virulencia en modelos experimentales, etc. (Brener *et al.*, 2000).

El análisis genético poblacional de *T. cruzi* demuestra que el mismo presenta una estructura clonal con diversidad genética y fenotípica (Tibayrenc *et al.*, 1986). Esto se refiere a un modelo con ausencia o limitada recombinación genética con persistencia de asociaciones multilocus duradera y cualquier mecanismo citológico de reproducción (Tibayrenc, 2010). Se han descrito al menos seis linajes genéticos distintivos (DTU del inglés Discrete Typing Unit) (Tybairenc, 1998; Barnabé *et al.*, 2000; Brisse *et al.*, 2000). Los que han sido recientemente validados por un comité de expertos y nombrados TcI al TcVI (Zingales *et al.*, 2009). TcI es prevalente en diferentes ciclos selváticos, es el responsable de las infecciones humanas en la región amazónica así como en algunos países del Cono Sur. Exhibe una diversidad genética considerable (Tibayrenc *et al.*, 1986; Lewicka *et al.*, 1995; Llewellyn *et al.*, 2009) con posibilidad de la existencia de subgrupos (Herrera *et al.*, 2009; Cura *et al.*, 2010). Por su parte TcII, TcV y TcVI se encuentran principalmente asociados con el ciclo doméstico y son prevalentes en infecciones humanas de países del Cono Sur. TcV y TcVI son genotipos híbridos siendo sus ancestros TcII y TcIII (Westenberg *et al.*, 2005; Broutin *et al.*, 2006). Finalmente TcIII y IV son aislamientos menos frecuentes que se encuentran a lo largo de las áreas endémicas y parecen estar más asociados a ciclos selváticos con algunos reportes de infección humana. Otros dos genotipos se han descrito relacionados a murciélagos: Tc-bat y *T. cruzi marinkellei* (Marcili *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2012).

Recientemente, Zingales (2017) presentó una revisión sobre algunos aspectos de la diversidad genética de *T. cruzi* y su estructura poblacional. El enfoque central de esta revisión está dedicado a discutir el impacto de la diversidad del parásito en las

manifestaciones de EC, el diagnóstico serológico y la susceptibilidad a los medicamentos.

La distribución general de aproximadamente 6400 DTU, en relación con su origen geográfico y asociación con huéspedes humanos, reservorios silvestres y vectores ya está disponible. La evidencia actual indica que todos los DTU pueden causar EC en humanos y que las cepas encontradas en los pacientes agudos y crónicos reflejan el linaje principal que circula en los ciclos de transmisión nacionales en esas áreas geográficas. A diferencia de varios brotes transmitidos por vía oral, las cepas selváticas han sido las más implicadas (Brenière *et al.*, 2016).

Una gran laguna de conocimiento es que no ha sido posible determinar una asociación entre el genotipo del parásito y la manifestación de EC en la fase crónica. Se ha atribuido a un progreso limitado por la escasez de parásitos en la sangre y la dificultad de muestreo de parásitos tisulares. Como factor de complicación adicional se ha considerado la precisión en la definición del estado clínico de la enfermedad del paciente. Sin embargo, dado que la evidencia experimental indica que la presentación de la tripanosomiasis americana está influenciada tanto por los factores del huésped como por el parásito, solo se obtendrá una respuesta a este tema si las características de la genética y la respuesta inmune del huésped se analizan junto con el genotipo de la cepa infectante. La identificación de los determinantes de la patogénesis puede tener un valor pronóstico de la evolución de la enfermedad, dictando posibles intervenciones para prevenir el desarrollo de enfermedades o mejorar las opciones de tratamiento (Zingales, 2017).

La respuesta inmune específica del huésped, con respecto a la especificidad y los títulos de anticuerpos anti-*T. cruzi*, también deben considerarse en la propuesta de una regla de oro para el diagnóstico serológico de EC. Actualmente, varios ensayos están siendo estandarizados. Sin embargo, solo serán aceptados si su sensibilidad se evalúa frente a un panel de sueros que represente pacientes de todos los países endémicos para *T. cruzi* (Zingales, 2017).

No hay duda que se necesitan con urgencia medicamentos nuevos, efectivos, seguros y asequibles para combatir esta entidad. En vista de la diversidad genética de *T. cruzi* hay cepas que muestran sensibilidades variables a las drogas disponibles, de ahí que

la detección debe hacerse con un panel de parásitos que representen diferentes DTU y parásitos considerados naturalmente resistentes a los medicamentos. Los esfuerzos para obtener nuevos medicamentos deben acompañarse con el desarrollo de pruebas para controlar el curso de tratamiento y certificar la cura (Zingales, 2017). De ahí que es importante tener en cuenta este elemento a la hora de diseñar y evaluar métodos de diagnóstico directo e indirecto.

3.3.4. Formas de transmisión.

Además de la principal vía de transmisión de *T. cruzi* que es la propagación vectorial, este parásito puede transmitirse a través de otras rutas. Estas tienen un papel importante en los países no endémicos y una importancia creciente en las áreas endémicas.

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 %) (Bern *et al.*, 2009; Murcia *et al.*, 2013; Howard *et al.*, 2014; Luquetti *et al.*, 2015). El principal determinante biológico para la transmisión congénita es la parasitemia, que podría ser tan alta como 31% cuando *T. cruzi* es detectable por la RCP, aunque la transmisión también es posible cuando la RCP es negativa (Bua *et al.*, 2012; Murcia *et al.*, 2013).

Trypanosoma cruzi también puede ser transmitido a través de sangre y productos sanguíneos; la tasa de transmisión estimada por unidad de sangre infectada es del 10-25% (Bern *et al.*, 2008; Cancino-Faure *et al.*, 2015). 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. 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 (Gascón *et al.*, 2010). 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 (Schmunis y Yadon, 2010).

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).

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). Otro modo de transmisión menos frecuente incluye accidentes de laboratorio (Hewaldt *et al.*, 2001).

3.4. 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 5). Según las últimas estimaciones realizadas por la OMS, basadas en datos del 2010, casi 6 millones de personas están infectadas por *T. cruzi* en los países endémicos de América Latina, de los cuales dos terceras partes son países pertenecientes al Cono Sur (WHO, 2015). 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 en 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).

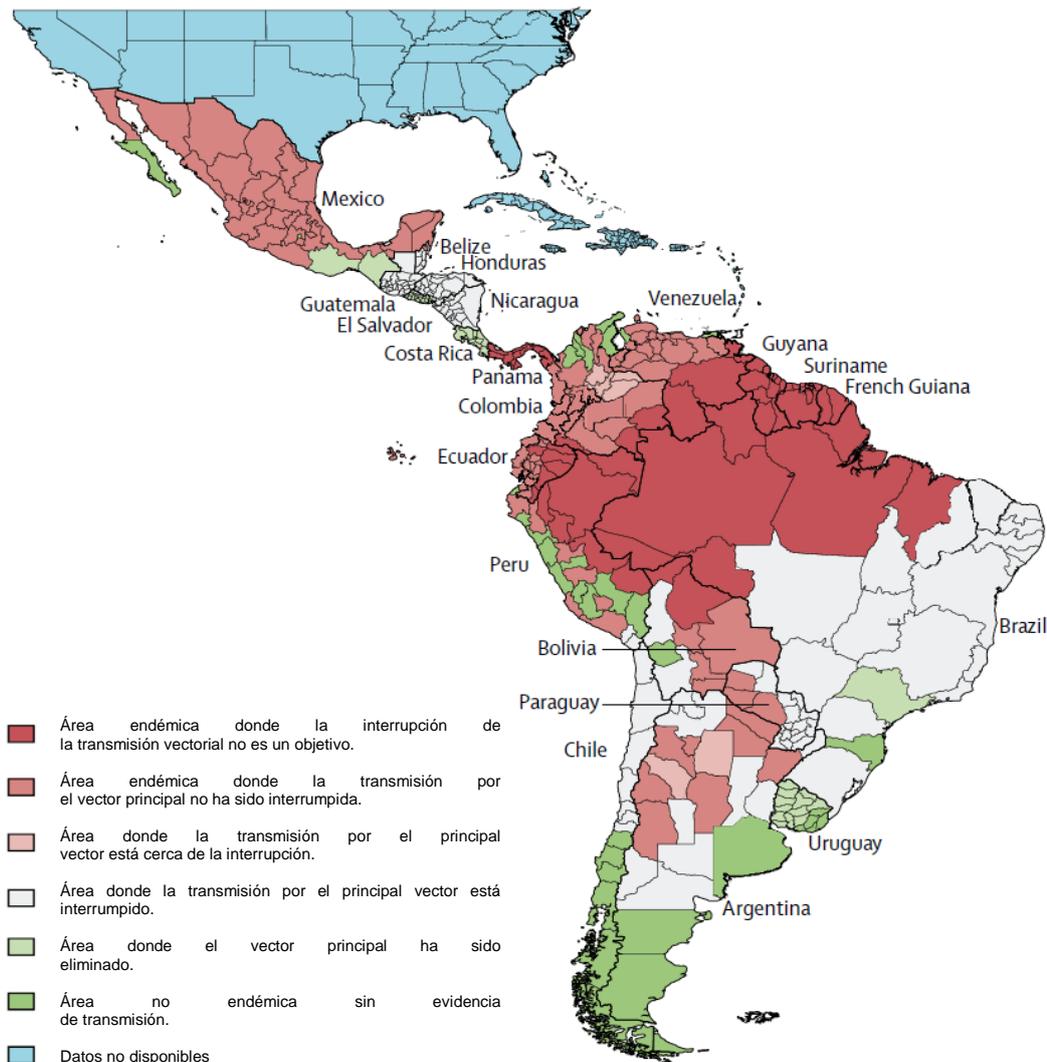


Figura 5. Transmisión de la enfermedad de Chagas por el vector principal, triatominae (septiembre de 2014). Adaptado del programa de control de la enfermedad de Chagas de la Organización Panamericana de la Salud Mundial.

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).

Hoy, 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 (Schmunis, 2007; Guerri-Guttenberget *et al.*, 2008; Bern y Montgomery, 2009; Gascon *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013; Pinto *et al.*, 2014). 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-Mendez *et al.*, 2015). En los Estados Unidos se estima que unos 300 000 inmigrantes están infectados con *T. cruzi* (Bern *et al.*, 2008). Sin embargo, el índice estimado de sub-diagnóstico es de alrededor del 95% (Basile *et al.*, 2011), y la experiencia de los profesionales de la salud en esta área es claramente insuficiente (Stimpert *et al.*, 2010)

3.5. 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 ganglio preauricular denominado signo de Romaña. Las manifestaciones de la enfermedad aguda se resuelven de manera espontánea en el 90 % de los individuos infectados, aun cuando la infección no sea tratada. 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; 0,2-0,5%) (Rassi *et al.*, 2010). La mayoría de los recién nacidos con infección congénita son asintomáticos o tienen síntomas leves, pero una minoría tiene una

enfermedad grave que amenaza la vida (Bittencourt *et al.*, 1975). 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 (Shikanai-Yasuda *et al.*, 2013). El tratamiento con la droga antiparasitaria puede usualmente curar la infección aguda y prevenir las manifestaciones crónicas (50-80 % de los casos) (Pinto *et al.*, 2009; 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. En esta fase el tratamiento con drogas antiparasitarias 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 (benzonidazol) tiene resultados de cura mucho menores que en el caso de la forma indeterminada (Rassi *et al.*, 2010) (Figura 6). Las manifestaciones clínicas relacionadas con cada una de las vías de transmisión y las fases de la enfermedad se muestran en el Anexo 2.

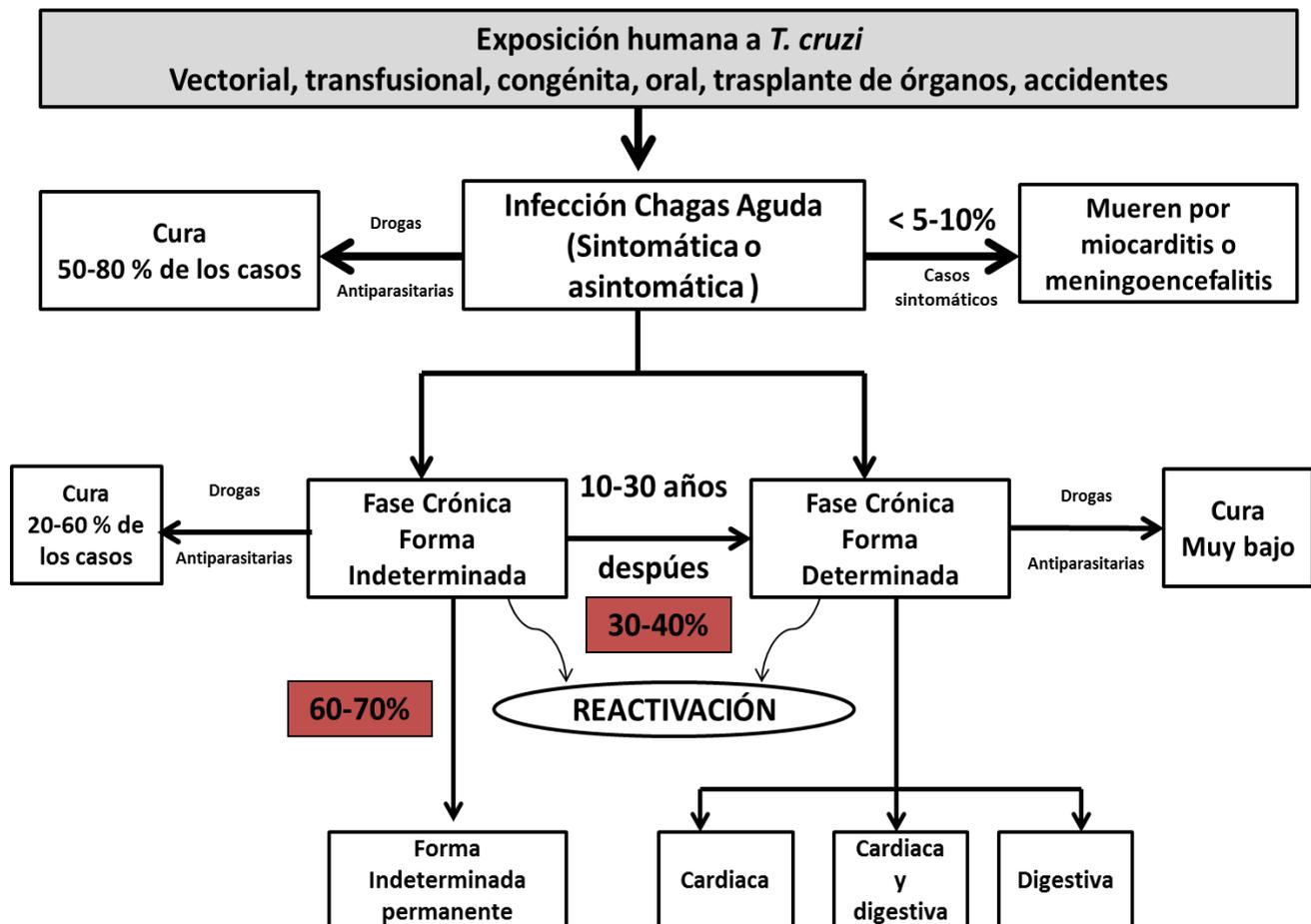


Figura 6. Historia natural de la Enfermedad de Chagas en el humano. Tomado de Rassi *et al.*, 2010

3.6. 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). 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 su presencia constante en esa etapa.

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.

3.6.1. 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 coloreado con Giemsa (sensibilidad 34–85%). Si estas pruebas fueran negativas, deben ser usados 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). *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).

3.6.2. Aislamiento del agente

Trypanosoma cruzi se puede cultivar a partir de tejidos o 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 triatóminos 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).

3.6.3. 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 (Gomes *et al.*, 2009). 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 (Bern *et al.*, 2007; Apt *et al.*, 2008). 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). 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 (Sanchez-Camargo *et al.*, 2014)

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 *et al.*, 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).

3.6.4. 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 ha sido utilizada en la investigación de *T. cruzi*, directamente en la sangre de pacientes crónicos, es el ensayo molecular por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP), 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; Diaz *et al.*, 1992; Kirchhoff *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 RCP son los minicírculos del kinetoplasto (Virreira *et al.*, 2003).

El genoma mitocondrial de *T. cruzi* está constituido por el ADN del kinetoplasto y representa cerca de 20% del ADN celular total. Está organizado en una estructura en red, en la cual millares de pequeñas moléculas circulares, los minicírculos, se encuentran concatenadas representando 95% del contenido de ADNk de la célula. Esas moléculas presentan características que las hacen blancos ideales de detección

por la RCP, tomando en consideración que se encuentran presentes en un elevado número de copias (entre 10 000 a 30 000 en dependencia del linaje) por red, más allá de que cada minicírculo contiene cuatro regiones de secuencias altamente conservadas y cuatro altamente variables presentes en todas las cepas y aislados representativos de los diferentes linajes de *T. cruzi*. Dentro de esta región se han diseñado juegos de cebadores para la región constante y para la región variable, obteniéndose mejores resultados de sensibilidad con los cebadores diseñados para la región variable entre los que se encuentran los cebadores 121-122 (Degrave *et al.*, 1988; Windker *et al.*, 1994; Britto *et al.*, 1995) y S35-S36 (Sturm *et al.*, 1988; Ávila *et al.*, 1991; 1994). Este juego de cebadores ha sido ampliamente usado para el diagnóstico de *T. cruzi* ya que al amplificar además el ADNk de *T. rangeli*, presentándose patrones de bandas de amplificación que pueden ser distinguidos entre ambos parásitos, le confiere una importancia adicional a este método (Sturm *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1993; Kirchhoff *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2002; Virreira *et al.*, 2003; Chipman Trejo *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2007; Pavia *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2009; Reisenman *et al.*, 2010; Cominetti *et al.*, 2011; Pavia *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2013; Mubiro *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015). Sin embargo, la capacidad de estos cebadores de detectar los diferentes linajes de *T. cruzi*, así como la sensibilidad analítica a *T. rangeli* no han sido verificadas hasta el momento.

Para el caso de la infección aguda la RCP 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 RCP tiene sensibilidad baja y variada que oscila entre el 50% y el 90% (Brasil *et al.*, 2010). De forma general los procedimientos de la RCP han mostrado valores variables de sensibilidad y especificidad dependiendo de un grupo de factores técnicos tales como: volumen de la muestra colectada, las condiciones y conservación de la muestra, el método utilizado para la extracción del ADN, la secuencia del parásito y los cebadores seleccionados, los reactivos usados así como las condiciones en el termociclador. La variabilidad de la sensibilidad de la RCP 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 RCP 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 (Ministério da Saúde 2005; Batista *et al.*, 2010; Blum-Dominguez *et al.*, 2011; Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2015; Pérez-Molina y Molina, 2018).

Existe un amplio debate sobre el tema, de ahí la necesidad de continuar los estudios de evaluación de técnicas de RCP así como la comparación de diferentes ensayos con vistas a determinar el método con mejor valor de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de EC, sobre todo en la fase crónica.

De forma general los métodos de diagnóstico recomendados en dependencia de las formas clínicas y las vías de transmisión se presentan en el Anexo.

3.7. Tratamiento

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. 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 (Pérez-Molina *et al.*, 2009) 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. 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 (Fabro

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).

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.*, 2012).

Las recomendaciones de tratamiento para cada una de las formas clínicas y vías de transmisión se presentan en el Anexo 3.

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

Un obstáculo importante para el desarrollo de fármacos es la mala traducción de los datos "in vivo" a la enfermedad humana. Los modelos animales disponibles tienen un valor predictivo limitado para la evaluación preclínica de terapias novedosas, y en parte explican los fracasos clínicos observados con nuevos triazoles (Francisco *et al.*, 2015). Los modelos animales tienen que predecir más confianza en la eficacia de los nuevos fármacos y los ensayos clínicos deben ser estandarizados (Chatelain *et al.*, 2015)

3.8. Control de la Enfermedad de Chagas.

La prevención de la infección requiere el control de transmisión vectorial y el "screening" de sangre y órganos para donación. Los viajeros deben evitar dormir en chozas o viviendas de barro potencialmente infestadas con triatomíneos, usar repelente de insectos y mosquiteros, y evitar tomar jugos de frutas o de cañas contaminados, tales como los proporcionados por los vendedores ambulantes. En el laboratorio, el personal debe utilizar equipos de protección adecuado para los organismos de riesgo 2. No hay vacuna disponible para la prevención de la transmisión de *T. cruzi*. Para evitar las graves consecuencias de la infección crónica, el diagnóstico precoz es crucial tanto en las zonas endémicas como no endémicas en las que se debería ofrecer un screening a todos los migrantes latinoamericanos (excluyendo a los del Caribe), especialmente a mujeres en edad fértil que podrían haber estado expuestas al vector o productos sanguíneos contaminados. La detección también debería ser ofrecida a niños cuyas madres nacieron en zonas endémicas y a todos los miembros de la familia de un caso índice (Zulantay *et al.*, 2013). Especialmente para

las poblaciones altamente prevalentes, el "screening" de la enfermedad de Chagas resulta beneficioso (Imaz-Iglesia *et al.*, 2015).

3.9. Situación de la Enfermedad de Chagas en Cuba.

En Cuba hasta el momento no se reportan casos autóctonos con EC, sin embargo, existe el riesgo de la 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 de la enfermedad y donde se ha demostrado la presencia de estudiantes con la enfermedad en nuestro país (Ruiz *et al.*, 2010; Serra *et al.*, 2012; Delgado *et al.*, 2016) y la presencia de cubanos por largos períodos de tiempo en estos países endémicos. Todo esto deduce la necesidad de contar en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" con herramientas moleculares que permitan junto a las herramientas serológicas complementar el algoritmo establecido para el diagnóstico de EC. Todo esto con el objetivo de cumplir con las necesidades y desafíos actuales para el manejo de esta entidad en países no endémicos de esta enfermedad y en específico para Cuba que se encuentran: aumentar la conciencia entre los profesionales sanitarios de la necesidad de buscar la enfermedad en las personas procedentes de zonas endémicas y conocer la prevalencia en estos grupos de personas, mejorar el conocimiento de EC entre los profesionales de la salud y la necesidad de contar con pruebas de diagnóstico rápido con una mayor sensibilidad que puedan usarse fácilmente, la necesidad de normalización de las técnicas de la RCP (Pérez-Molina, 2012).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo de estudio

Se realizó un estudio de validación de pruebas diagnósticas en el período de tiempo comprendido entre los años 2015 y 2016, 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* y otros trypanosomatideos caracterizadas como referencia, muestras de ADN de otros microorganismos infecciosos y ADN procedente de muestras clínicas de individuos; todos los cuales se detallan a continuación.

4.2.1 Cepas de referencia de *Trypanosoma spp.*

Se utilizaron como cepas de referencia muestras de ADN de 11 cepas de *T. cruzi* correspondientes a los diferentes linajes del parásito procedentes de diferentes orígenes geográficos, 1 cepa de *T. cruzi marinkellei*, 16 cepas de *T. rangeli*, una cepa de referencia de cada una de las siguientes especies: *T. brucei brucei*, *T. brucei rhodesiense*, *T. brucei gambiense*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. congolenses*, *T. vivax* y *T. theileri* provenientes de la Unidad de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes (IMT-A) (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 RCP-miniexon determinados en los laboratorios de los países de origen (Bosseno *et al.*, 1996; Breniere *et al.*, 1997; 1998; Bernabé *et al.*, 2000).

Tabla 1. Cepas de referencia de *Trypanosoma* spp. utilizadas en el estudio.

Especie	Nombre de la cepa	Genotipo	País de procedencia
<i>Trypanosoma cruzi</i>	SP104	I	Bolivia
	OPS21	I	Venezuela
	MAS	II	Brasil
	Esm	II	Brasil
	M5631	III	Brasil
	CanIII	IV	Brasil
	S03	V	Bolivia
	SC43	V	Bolivia
	MN	V	Chile
	P63	VI	Paraguay
	Tula	VI	Chile
<i>Trypanosoma rangeli</i>	RPLA4	nd	Venezuela
	CAN AC	nd	-
	CAS3	nd	-
	LEM2946	nd	Guyana Francesa
	LEM2963	nd	Guyana Francesa
	B28V1A06P2C3	nd	-
	B28V1A06P1C1	nd	-
	LEM2947	nd	Guyana Francesa
	R1271	nd	-
	Sjm30	nd	-
	TET2408cl1	nd	Ecuador
	TET2408cl4	nd	Ecuador
	TET2414	nd	Ecuador
	TET2417	nd	Ecuador
	TPY2422	nd	Ecuador
	TCI2307	nd	Ecuador
<i>T. cruzi marinkellei</i>	M1009	nd	Venezuela
<i>T. brucei brucei</i>	AnTat17.1	Tipo 1	Congo
<i>T. brucei gambiense</i>	AnTat9.1	nd	Camerum
<i>T. brucei rhodesiense</i>	AnTat 25.1	nd	Ruanda
<i>T. congolense</i>	SER/71/STIB212	Savannah	Tanzania
<i>T. equiperdum</i>	940M	nd	-
<i>T. theileri</i>	T. thei	nd	-
<i>T. evansi</i>	Rotat 1.2	nd	Indonesia
<i>T. vivax</i>	Y486	Oeste de África	Nigeria

nd: no determinado su genotipo.

4.2.2 Muestras de ADN de otros agentes infecciosos

Se utilizaron muestras de ADN de distintos agentes infecciosos provenientes del Banco de ADN del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología, IPK: *Toxoplasma gondii*; del Laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes (IMT-A): *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/06/ICA), *L. peruviana* (MHOM/PE/90/LCA08_cl.2), *L. naiffi* (MDAS /BR/78/M5210), *L. guyanensis* (MHOM/PE/02/LH2372), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), *L. donovani* (MHOM/SD/--/1-S), *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM75), *L. chagasi* (MHOM/BR/07/WC), *L. major* (MHOM/IL/67/LRC-L137), *L. tropica* (MHOM/PS/01/ISL590), *L. aethiopica* (--/KE/--/161B), del Departamento de Bacteriología del IPK: *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida parasilopsis*, *Cryptococcus neoformans*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium habana*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis* y del Departamento de Virología del IPK: *Herpes zoster*, *Cytomegalovirus* y *Herpes simplex*.

4.2.3 Muestras clínicas humanas

Se utilizaron 88 muestras de ADN extraídas a partir de muestras clínicas humanas (sangre total) recibidas en los servicios de diagnóstico molecular del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología, en el período comprendido entre los años 2015 y 2016. En el caso de los individuos procedentes de áreas endémicas de la Enfermedad de Chagas son resultado de la pesquisa de rutina realizada a su ingreso al país, establecida por el Programa de Control Sanitario Internacional del MINSAP.

La extracción de ADN a partir de la muestra de sangre se obtuvo utilizando el estuche de extracción QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante y se resuspendió en un volumen final de 50 µL, conservándose a 4°C hasta la realización del ensayo molecular.

Se realizaron estudios serológicos previos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas incluidas dentro del Proyecto asociado a Programa "Desarrollo de capacidades para el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana y Africana en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", que se encuentra en curso.

Los pacientes o individuos que se utilizaron en este estudio se encuentran clasificados en cinco grupos teniendo en cuenta las variables epidemiológicas y el resultado de las pruebas serológicas obtenidas por los métodos de UMELISA® CHAGAS (Centro de Inmunoensayo, Cuba), SmartTest ELISA Ab (SmartTest, Diagnostics, Iran) y la tira rápida SD Chagas Ab Rapid (Standar Diagnostic, INC, Korea), los métodos serológicos a cada individuo se realizaron en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK a partir de suero humano. Se consideraron además los criterios de la OPS/OMS que determina que un paciente es confirmado como positivo a la EC cuando tiene dos pruebas serológicas positivas realizados por métodos de principios diferentes:

- Grupo A, Chagas confirmado área endémica. Conformado por 22 pacientes procedentes de Bolivia y tres pruebas serológicas positivas a EC
- Grupo B, Chagas no confirmado área endémica. Conformado por 20 individuos sanos procedentes de Bolivia y tres pruebas serológicas negativas a EC
- Grupo C, Chagas no confirmado cubanos. Conformado por 15 pacientes cubanos con toxoplasmosis confirmada y tres pruebas serológicas negativas a EC.
- Grupo D, Chagas no confirmado cubanos en áreas endémicas. Conformado por 13 individuos cubanos procedentes de áreas endémicas de Chagas (Bolivia, Venezuela) y tres pruebas serológicas negativas a EC
- Grupo E, Chagas dudoso cubanos en áreas endémicas. Conformado por 18 individuos cubanos procedentes de áreas endémicas (Bolivia y Venezuela) con una prueba serológica positiva a EC (UMELISA® CHAGAS) y dos pruebas serológicas negativas.

4.3 Normalización de la RCP ADNk (S35-S36)

Se normalizaron los componentes de la reacción de amplificación utilizando los cebadores sintéticos específicos S35 y S36 (Tabla 2; Figura 7), que amplifican una región de 330 pb del ADNk de *Trypanosoma* spp. (Sturm *et al.* 1989).

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificar la región específica del ADNk de *T. cruzi*.

Cebador	Secuencia (5'- 3')
S35	AAATAATGTACGGGT/GGAGATGCATGA
S36	GTTTCGATTGGGG TTGGTGTAAATATA

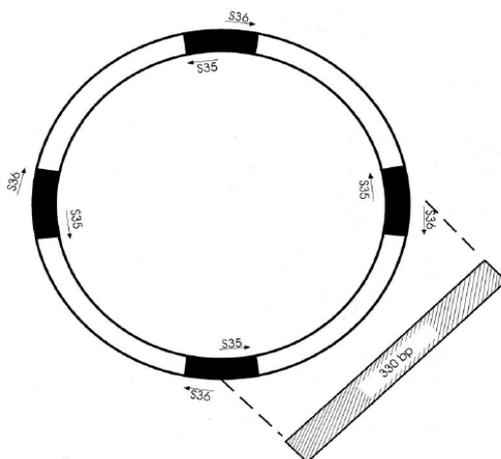


Figura 7. Representación esquemática de los minicírculos del ADNk de *T. cruzi*. Los rectángulos en negro representan las 4 regiones conservadas de 120 pb. Las flechas indican el sitio relativo de hibridación de los cebadores S35 y S36 que amplifican un producto de 330 pb.

Para ello se realizaron distintos experimentos. La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 25 μL , conformado por 2,5 μL solución amortiguadora coloreado de la RCP 1 x (CoralLoad PCR buffer, en inglés), 1,5 mM de MgCl_2 (Qiagen, Hilden, Alemania), 5 μL de solución amortiguadora Q 1 x (Qiagen, Hilden, Alemania), 200 μM de cada desoxinucleótido trifosfato (dNTPs) (Eurogentec, Bélgica) y 10fg de ADN molde a amplificar (Cepa: MHOM/VE/77/OPS21). El resto de los componentes de la mezcla de reacción fueron evaluados a diferentes concentraciones: cebadores (0,2; 0,4; 0,6; 0,8, 1 μM) (Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba), enzima HotStarTaqPlus ADN polimerasa (Qiagen, Hilden, Alemania) (0,5; 1; 1,5; 2U); MgCl_2 (1,5; 2; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 mM) (Qiagen, Hilden, Alemania), cada uno de manera individual y manteniendo el resto de los parámetros constantes. Se incluyó un control negativo en cada experimento, que contuvo H_2O destilada estéril en lugar de ADN molde de *T. cruzi*.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador (MJ Research, EUA) con el siguiente programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 $^\circ\text{C}$ por 5 min seguido de 35 ciclos de: desnaturalización a 94 $^\circ\text{C}$ por 40 seg, hibridación; donde se evaluó un gradiente de temperaturas (52,2; 52,6; 53,6; 57,3; 59,7; 62; 67,4; 68,8; 70 $^\circ\text{C}$) por 1

min y extensión a 72 °C por 1 min, con una extensión final después del último ciclo a 72 °C por 10 min.

Para la detección del producto de amplificación se analizaron 15 µL de cada mezcla resultante en electroforesis en gel de agarosa 2%, preparado en tampón tris-borato-EDTA: tris-borato (0,045 mol/L), EDTA (0,001 mol/L) (TBE 0,5x) con bromuro de etidio 0,5 µg/mL. La visualización de los productos de amplificación se realizó mediante luz ultravioleta y se utilizó un sistema compacto de imágenes de geles U:Genius (Syngene, Reino Unido).

4.4 Análisis de parámetros analíticos de la RCP ADNk (S35-S36)

4.4.1 Sensibilidad analítica de la RCP ADNk (S35-S36)

Este experimento permitió conocer el nivel de detección de parásito en la RCP. Se realizaron diluciones seriadas (1/10) en agua destilada estéril desde 1 ng hasta 10 fg, utilizando ADN de cepas representativas de cada uno de los linajes de *T. cruzi* de I al VI, así como de *T. rangeli*. Posteriormente, se realizó la RCP siguiendo las condiciones previamente normalizadas, en el mismo volumen final, y los productos de amplificación de todas las diluciones realizadas se observaron en una corrida electroforética en las condiciones descritas en el acápite 4.3.

4.4.2 Especificidad analítica de la RCP ADNk (S35-S36)

Para estudiar la especificidad analítica de la RCP, se utilizó como molde 10 ng de ADN de distintos trypanosomas: *T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*, *T. vivax*, *T. evansi*, *T. equiperdum* y *T. cruzi marinkellei*, así como otros microorganismos previamente mencionados en el acápite 4.2.2 (Tabla 1). Se realizó la reacción de amplificación de la RCP ADNk en las condiciones previamente normalizadas. Se preparó un tubo control positivo con 1ng de ADN de *T. cruzi* de la cepa MHOM/VE/77/OPS21 y un control negativo con agua bidestilada estéril en vez de ADN molde. El resultado se observó mediante una corrida electroforética en gel de agarosa (acápite 4.3).

4.4.3 Repetibilidad de la RCP ADNk (S35-S36)

Se comprobó la variabilidad intrínseca de la reacción o repetibilidad, realizando la RCP en tres días diferentes, utilizando los mismos reactivos, equipos, procedimientos y

condiciones generales y ADN de seis cepas de *T. cruzi* (Tipo I:MHOM/VE/77/OPS21, Tipo II: MHOM/BR/--/MAS; Tipo III: MDAS/BR/81/M5631; Tipo IV: MHOM/BR/78/CanIII; Tipo V: ITRI/BO/86/S03; Tipo VI: MHOM/CL/00/Tula). Los resultados se comprobarán mediante electroforesis según se describió en el acápite 4.3.

4.4.4 Reproducibilidad de la RCP ADNk (S35-S36)

Se prepararon mezclas de reacción con las cantidades previamente normalizadas, utilizando como molde ADN genómico de cepas correspondientes a 6 linajes de *T. cruzi* (Tipo I:MHOM/VE/77/OPS21, Tipo II: MHOM/BR/--/MAS; Tipo III: MDAS/BR/81/M5631; Tipo IV: MHOM/BR/78/CanIII; Tipo V: ITRI/BO/86/S03cl5; Tipo VI: MHOM/CL/00/Tula), para la amplificación del ADNk en distintas condiciones, tanto en el IPK, Cuba; como en el laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. Las mezclas se amplificaron en los correspondientes termocicladores de cada laboratorio y se verificaron los resultados en corridas electroforéticas realizadas según las condiciones pre-establecidas en cada uno (acápites 4.3).

4.5 Evaluación de la utilidad de la RCP ADNk (S35-S36)

Se realizó la RCP-ADNk (S35-S36) en las condiciones previamente normalizadas utilizando como molde el ADN obtenido de un grupo de cepas y aislamientos de *T. cruzi* y *T. rangeli* con una variada representación geográfica (Tabla 1).

De igual forma se realizó el mismo procedimiento descrito en el acápite 4.2.3 utilizando como molde ADN obtenido de muestras de sangre periférica de individuos, y se comprobó el valor diagnóstico que pudiera tener este método.

4.5.1 Validez diagnóstica de la RCP ADNk (S35-S36)

La validez de la RCP ADNk se evaluó a partir de la determinación de la sensibilidad y especificidad diagnóstica (Altman y Bland, 1994a,b). Para determinar la validez diagnóstica se utilizó el programa EPIDAT 3.1 (2006). Para este análisis, se utilizó una tabla de contingencia de 2x2. En la misma se enfrentó el resultado de la RCP-ADNk (en filas), con el resultado de la prueba de referencia (en columnas). La prueba de referencia se basó en la positividad de las muestras a dos técnicas serológicas. A partir de este resultado se agruparon las muestras de individuos en dos grupos: I) casos confirmados con Chagas (muestras con serología positiva por tres ensayos; Grupo A) y

II) casos sin Chagas (muestras con serología negativa por dos o tres ensayos Grupos B, C, D).

4.6. Consideraciones éticas

Esta investigación constituye una de las tareas del Proyecto **“Desarrollo de capacidades para el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis americana y africana en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”**. El proyecto fue evaluado y aprobado para su ejecución por el Comité de Ética Institucional del IPK (Proyecto de Investigación CEI-IPK-03-13).

En este 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.

El protocolo de estudio incluyó un grupo control que es imprescindible para la evaluación de la validez y seguridad diagnóstica de las técnicas a evaluar. El mismo lo constituyeron las muestras que resultaron negativas a las pruebas serológicas para EC.

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 2014 y 2016. 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 8mg/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.

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 alguno 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 (Anexo 4). Una vez firmado el mismo se procedió a la toma de la muestra para los efectos de la investigación.

5. RESULTADOS

5.1. Normalización de la técnica de RCP ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de *T. cruzi*.

Se normalizó la técnica de la RCP ADNk utilizando el juego de cebadores S35-S36 que amplifica una región específica de 330 pb dentro de la secuencia de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi*. Fueron determinadas las condiciones óptimas de los componentes de la reacción de la RCP, probándose diferentes concentraciones de $MgCl_2$, cebadores y Taq ADN polimerasa. En todos estos casos se mantuvo constante en la mezcla de reacción la cantidad de dNTPs, tampón de amplificación y las condiciones en el termociclador (Figura 8 A, B y C). De igual forma se probaron diferentes temperaturas de hibridación manteniendo constantes los componentes de la mezcla de reacción (Figura 8D).

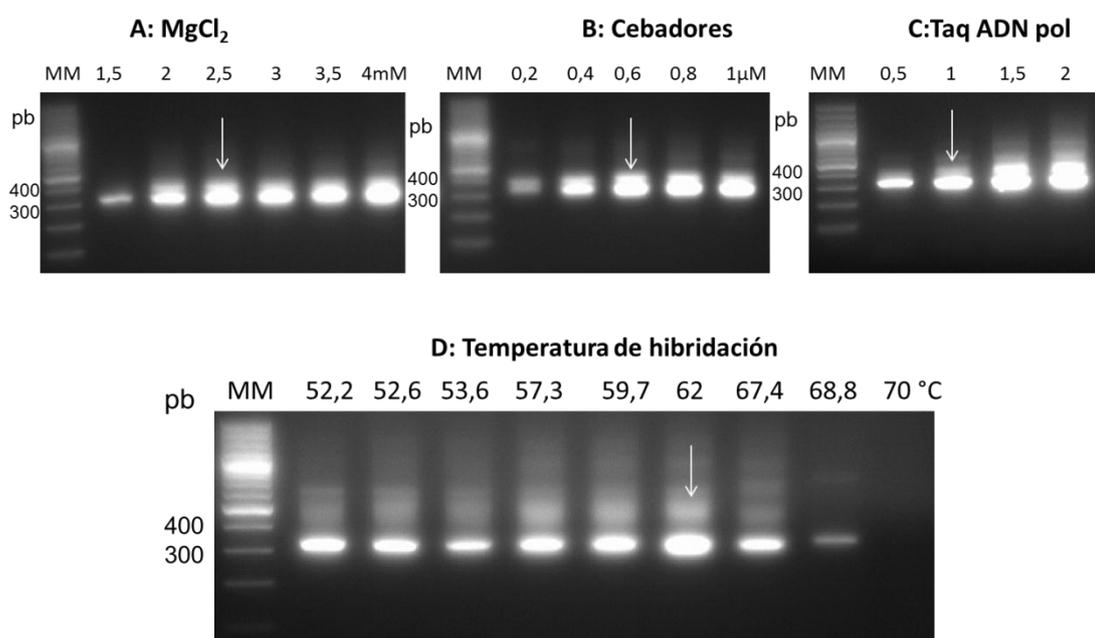


Figura 8. Patrón de amplificación obtenido al variar la concentración de los componentes de la RCP ADNk y la temperatura de hibridación en las condiciones en el termociclador. A) $MgCl_2$, B) Cebadores, C) Taq ADN polimerasa, D) Gradiente de temperatura de hibridación. Las concentraciones de los componentes de la reacción y la temperatura evaluadas aparecen especificadas en cada carril. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). La flecha indica las condiciones óptimas en cada caso.

En la Figura 8A se aprecia que la banda amplificada aumenta su intensidad desde 1,5mM hasta 2,5mM de $MgCl_2$ y que al incrementar la concentración hasta 4mM la intensidad de la banda se mantuvo constante. De ahí que consideramos 2,5mM como la concentración óptima del $MgCl_2$.

En la Figura 8B se aprecian los patrones de amplificación al variar las concentraciones de cebador desde 0,2 μ M hasta 1 μ M. Al utilizar 0,2 μ M la banda esperada aparece de forma muy tenue. A partir de 0,6 μ M aumenta la intensidad de la banda con respecto a las dos primeras concentraciones, y se mantiene aumentando en la medida que lo hace la concentración del cebador. Asumimos como concentración óptima 0,6 μ M, al observarse mayor intensidad con la menor cantidad de cebador a utilizar.

En la Figura 8C se observa como a partir de 0,5U y hasta 2.0U de la enzima Taq ADN polimerasa ocurre un aumento en la intensidad de la banda amplificada. Se consideró como concentración óptima 1,0U en 25 μ L de reacción donde se obtiene una banda con intensidad adecuada para la reacción de la RCP.

Una vez optimizados los componentes de la mezcla de reacción de la RCP, se modificaron las condiciones en el termociclador, probándose diferentes temperaturas de hibridación (Figura 8D). Se consideró como temperatura óptima 62°C, con la cual aparece una banda de amplificación con mayor intensidad.

En la Tabla 3 y 4 se resumen las condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de reacción de la RCP-ADNk y las condiciones óptimas en el termociclador.

Tabla 3. Condiciones óptimas de los componentes de la mezcla de la RCP-ADNk, utilizando la cepa MHOM/VE/77/OPS21 de *T. cruzi* y el juego de cebadores S35-S36.

Componentes	Concentración final
MgCl ₂	2.5 mM
Cebadores	0.6 μM
Taq ADN pol	1 U
Buffer Taq	1x
Q buffer	1x
dNTP	200 μM

Tabla 4. Condiciones óptimas de las condiciones de la reacción de la RCP-ADNk, utilizando la cepa MHOM/VE/77/OPS21 de *T. cruzi* y el juego de cebadores S35-S36.

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	40 seg	35 ciclos
Hibridación	62 °C	1 min	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	8 min	1 ciclo

5.2. Determinación de la sensibilidad y especificidad analíticas de la técnica, así como la repetibilidad y reproducibilidad

La sensibilidad analítica de la RCP-ADNk se evaluó en un panel constituido por seis asilamientos de *T. cruzi* correspondientes a los seis linajes de este parásito, en todos los casos se utilizaron diluciones del ADN extraído de los cepas de referencia. Para los seis linajes del parásito fue posible detectar hasta 0,01pg (10fg), última concentración en la que se observó la banda esperada, de 330pb, en cada caso (Figura 9). Esta detección representa aproximadamente 1 parásito, considerando que el molde de 330pb del ADNk en un parásito es aproximadamente 15fg (Centurion-Lara *et al.*, 1994).

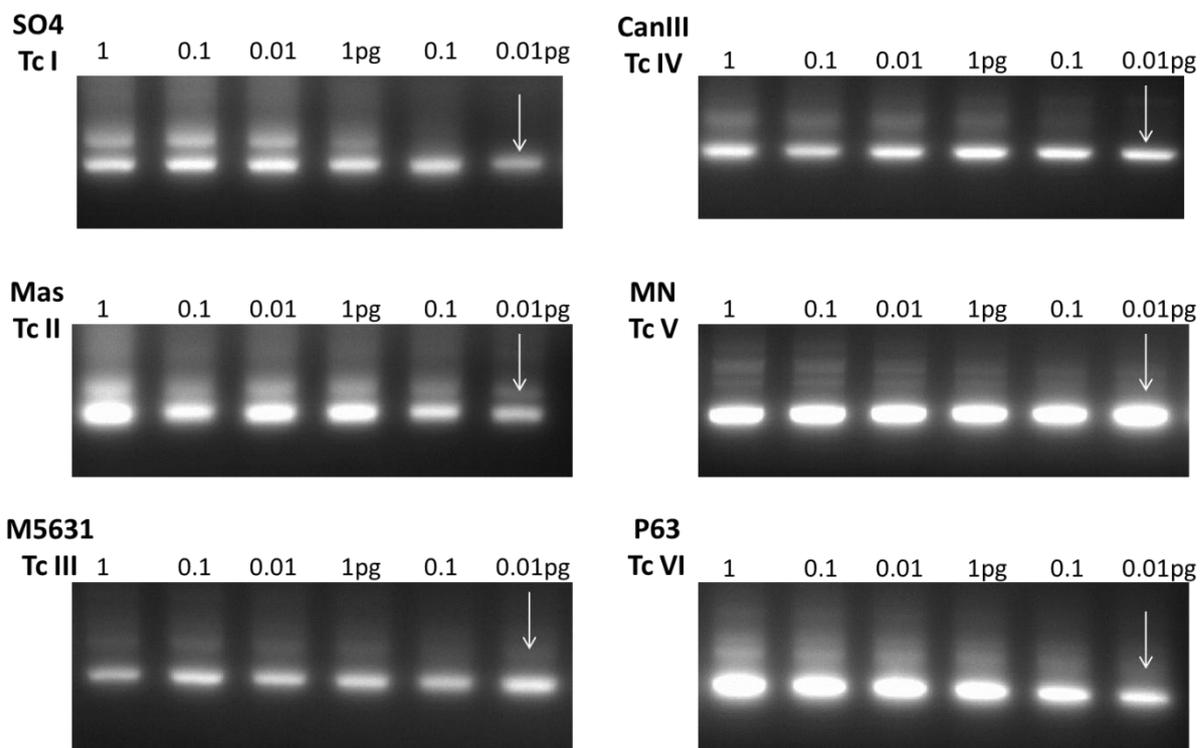


Figura 9. Sensibilidad analítica de la RCP-ADNk. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN. Se especifica la cepa de *T. cruzi* utilizada y el linaje al que corresponde en la parte superior izquierda de cada gel presentado. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Las cantidades de ADN de *T. cruzi* se indican en cada carril. La flecha indica las condiciones ópticas en cada caso.

En la evaluación de la especificidad analítica se utilizó un panel de muestras de ADN de distintos agentes infecciosos agrupados en parásitos, bacterias, hongos y virus. Para el caso de las bacterias, virus y hongos evaluados no se obtuvo el patrón de amplificación correspondiente a la banda específica de 330 pb ADNk de *T. cruzi*. Para el caso de los parásitos evaluados no hubo amplificación para *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, ni para ninguna de las especies de *Leishmania* estudiadas (Figura. 10A). Al evaluar otras especies de *Trypanosoma*, se obtuvo la banda de amplificación de alrededor de 330pb al evaluar las subespecies de *T. brucei* (*T. brucei brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. brucei rhodesiense*), *T. congolense*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, así como *T. cruzi marinkellei* (Figura. 10B).

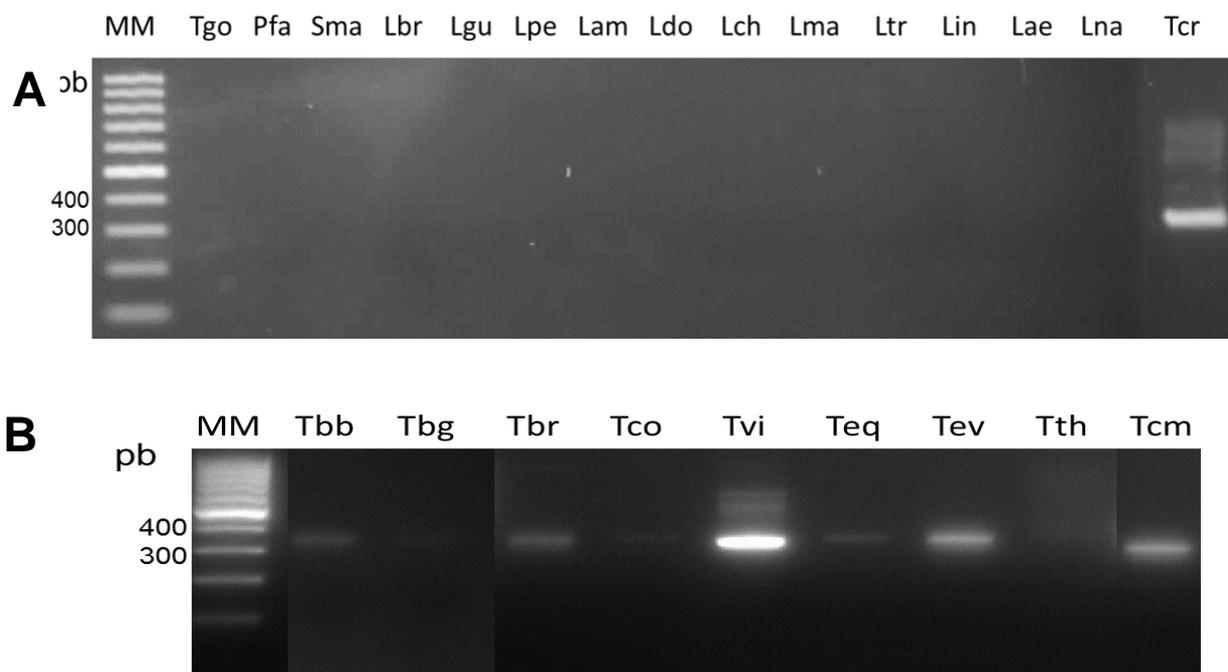


Figura 10. Resultado de la especificidad analítica de la RCP ADNk. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante RCP ADNk utilizando diferentes especies de parásitos. A: *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* y especies de *Leishmania*; B: especies y subespecies de *Trypanosoma*. En cada carril se presenta las especies y subespecies de parásitos estudiados. (A) Tgo: *Toxoplasma gondii* Cepa RH; Pfa: *Plasmodium falciparum*, Sma: *Schistosoma mansoni*, Lbra: *Leishmania braziliensis* (MHOM/BR/06/ICA), Lgu: *L. guyanensis* (MHOM/PE/02/LH2372), Lpe: *L. peruviana* (MHOM/PE/90/LCA08_cl.2), Lam: *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), Ldo: *L. donovani* (MHOM/SD/--/1-S), Lch: *L. chagasi* (MHOM/BR/07/WC), Lma: *L. major* (MHOM/IL/67/LRC-L137), Ltr: *L. tropica* (MHOM/PS/01/ISL590), Lin: *L. infantum* (MHOM/FR/78/LEM75), Lae: *L. aethiopica* (--/KE/--/161B), Lna: *L. naiffi* (MDAS /BR/78/M5210), Tcr: *T. cruzi* MHOM/VE/77/OPS21. (B) Tbb: *T. brucei brucei* AnTat17.1, Tbg: *T. brucei gambiense* AnTat9.1, Tbr: *T. brucei rhodesiense* AnTat 25.1, Tco: *T. congolense* SER/71/STIB212, Tvi: *T. vivax* Y486, Teq: *T. equiperdum* 940M, Tev: *T. evansi*, Rotat 1.2, Tth: *T. theileri* T. thei; Tcm: *T. cruzi marinkellei* M1009. En todos los casos se presenta la amplificación con 10ng de ADN. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

La repetibilidad se confirmó realizando la RCP según las condiciones normalizadas, en tres días diferentes, utilizando los mismos reactivos, equipos, procedimientos y ADN de

seis cepas de *T. cruzi* correspondiente a los linajes del parásito. No se encontraron diferencias entre los patrones de amplificación (Figura 11).

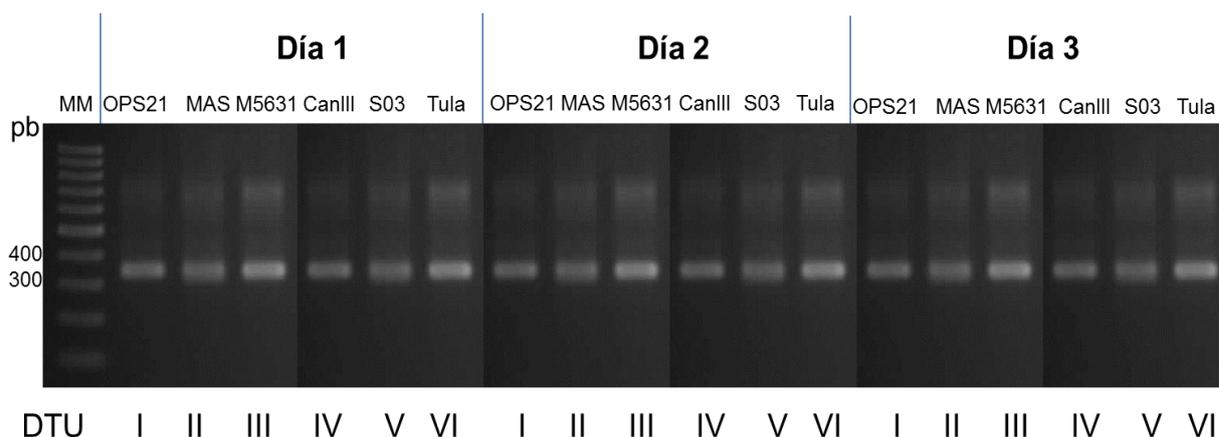


Figura 11. Resultados de la repetibilidad de la RCP ADNk. Electroforesis en gel de agarosa 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante RCP ADNk utilizando diferentes cepas con diferentes linajes. En la parte superior de cada carril se presenta las cepas de *T. cruzi* estudiadas, en la parte inferior se presenta el linaje a que corresponde (DTU). MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

Con relación a la reproducibilidad se prepararon mezclas de reacción con las cantidades previamente normalizadas, utilizando como molde ADN genómico de cepas correspondientes a seis linajes de *T. cruzi*, para la amplificación del ADNk en distintas condiciones, tanto en el IPK, Cuba; como en el laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica. Las mezclas se amplificaron en los correspondientes termocicladores de cada laboratorio. No se obtuvieron diferencias en los patrones de amplificación obtenidos entre ambos laboratorios como se presenta en la Figura 12.

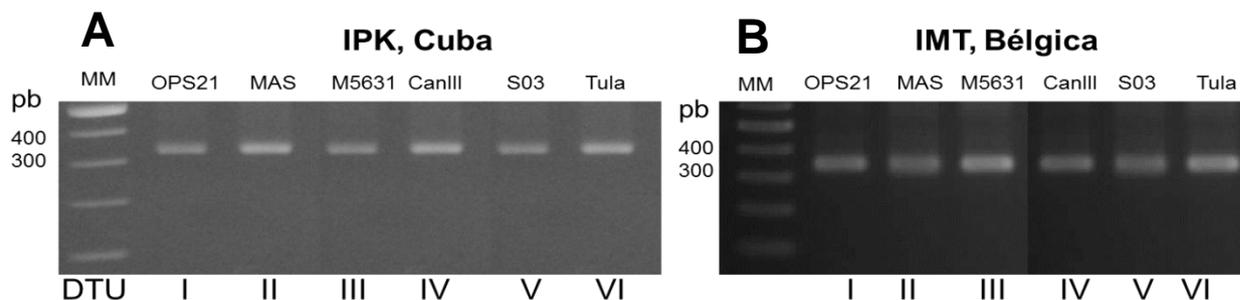


Figura 12. Resultados de la reproducibilidad de la RCP ADNk. Electroforesis en gel de agarosa 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante la RCP ADNk utilizando diferentes especies de parásitos realizadas en IPK, Cuba (A) y en el laboratorio de Parasitología Molecular del Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica (B). En la parte superior de cada carril se presenta las cepas de *T. cruzi* estudiadas y en la parte inferior al linaje a que corresponden. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

5.3. Evaluar la potencialidad de la técnica para la diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli*.

La RCP ADNk utilizando el juego de cebadores S35-S36 fue evaluada en un panel de cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* con vistas a determinar la potencialidad de la técnica para diferenciar ambas especies de *Trypanosoma*. Como se observa en la Figura 13 se obtiene un patrón que es capaz de diferenciar ambas especies. Para *T. cruzi* se obtiene una banda bien definida de 330pb y para el caso de *T. rangeli* se obtiene un patrón de bandas desde 300 hasta 450pb.

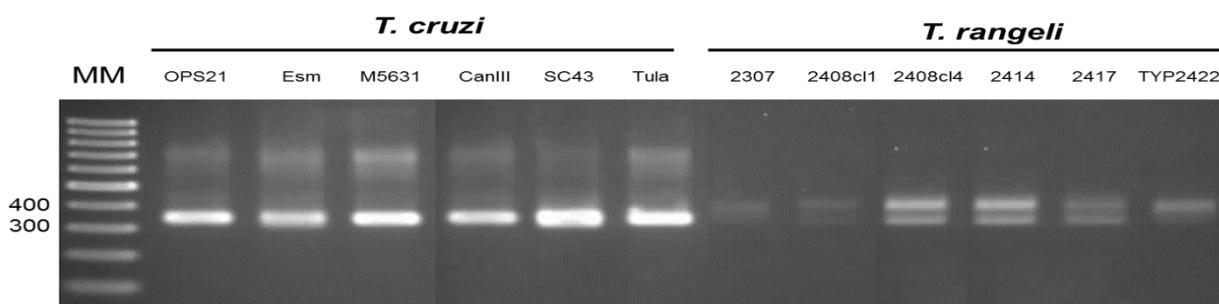


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa 2 % que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante la RCP ADNk utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli*. En la parte superior de cada carril se presenta las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* estudiadas. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

Sin embargo, al analizar la sensibilidad analítica de la técnica utilizando dos cepas de referencia de *T. rangeli* podemos observar que solo es capaz de detectar entre 1 y 0,1 ng de ADN, lo que equivale entre 6 666 a 66 666 parásitos. Esto representa una muy baja sensibilidad analítica, para ser utilizado en el diagnóstico y diferenciación de estos parásitos (Figura 14).

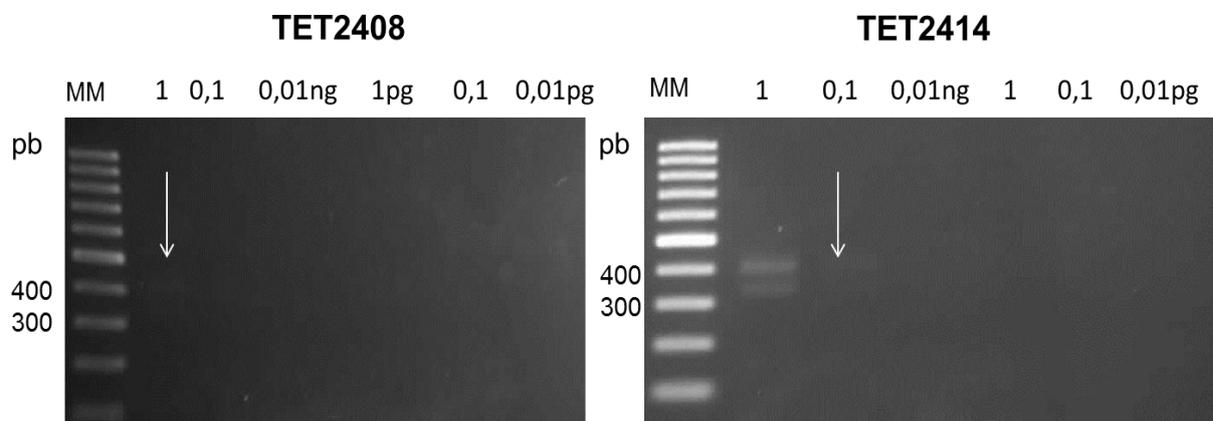


Figura 14. Sensibilidad analítica de la RCP ADNk para *T. rangeli*. Electroforesis en gel de agarosa al 2% que muestra los resultados de la amplificación del ADN mediante RCP ADNk utilizando diferentes cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli*. En la parte superior de cada carril se presenta las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli* estudiadas. MM: Marcador de Peso Molecular, Molecular Gene™ Ruler 100bp DNA ladder plus (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania).

5.4. Evaluar la utilidad de la RCP ADNk en la detección de *T. cruzi* a partir de sangre periférica en un grupo de pacientes estudiados

Para evaluar la utilidad de la RCP ADNk se utilizaron 88 muestras de ADN extraídas a partir de sangre total. Las muestras clínicas que se utilizaron en este estudio se clasificaron en cinco grupos teniendo en cuenta las variables epidemiológicas y el resultado de las pruebas serológicas obtenidas por los métodos de UMELISA® CHAGAS (Centro de Inmunoensayo, Cuba), SmartTest ELISA Ab (SmartTest, Diagnostics, Iran) y la tira rápida SD Chagas Ab Rapid (Standar Diagnostic, INC, Korea). Los resultados de la RCP en cada uno de estos grupos se presentan en la Tabla 5. De los pacientes con Enfermedad de Chagas confirmada teniendo en cuenta la positividad a las tres pruebas serológicas correspondientes al Grupo A, 19 resultaron positivos y 3 resultaron negativas. Los pacientes de los grupos B, C, D (48 pacientes) cuyos resultados fueron negativos por los tres métodos serológicos utilizados, solo en un caso la RCP resultó positiva. En los pacientes estudiados en el grupo E, que tienen

un resultado serológico positivo por UMELISA® CHAGAS y los otros dos métodos serológicos negativos, la RCP resultó negativa para todos los casos.

Tabla 5. Resultados de la RCP ADNk en los grupos de pacientes estudiados.

Grupo	Clasificación general	n	RCP ADNk	
			Positivos	Negativos
Grupo A	Chagas confirmado área endémica	22	19	3
Grupo B	Chagas no confirmado área endémica	20	0	20
Grupo C	Chagas no confirmado cubanos	15	0	15
Grupo D	Chagas no confirmado cubanos en área endémica	13	1	12
Grupo E	Chagas dudoso cubanos en área endémica	18	0	18

Teniendo en cuenta como "regla de oro" los criterios de la OMS/OPS que determinan que un paciente es confirmado cuando tiene dos pruebas serológicas positivas realizadas por dos métodos serológicos de principios diferentes (Bern *et al.*, 2007; Apt *et al.*, 2008) se determinó la validez de la RCP ADNk a partir del cálculo de la sensibilidad y especificidad diagnóstica. La sensibilidad resultó ser de 86,36% (IC 95% 69,75-100) y la especificidad de 97,92% (IC 95% 97,83 -100) (Tabla 6).

Tabla 6. Relación entre los resultados de la RCP-ADNk normalizada y la presencia o ausencia de EC, considerando como regla de oro los resultados a dos pruebas serológicas.

RCP-ADNk	Pacientes		Total de Pacientes
	Con Enfermedad de Chagas	Sin Enfermedad de Chagas	
Positivo	19 (86,4% ^a)	1	20
Negativo	3	47(97,9% ^b)	50
Total de pacientes	22	48	70

^a Sensibilidad diagnóstica de la RCP-ADNk

^b Especificidad diagnóstica de la RCP-ADNk

6. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre periférica mediante la RCP se ha utilizado cada vez más (Molina *et al.*, 2016). Las dianas más utilizadas son la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto, secuencias repetidas en el ADN satélite o genes del ARN ribosomal (Schijman *et al.*, 2011). La fase aguda de la enfermedad o en la reactivación durante la fase crónica ha resultado ser de gran utilidad la detección molecular, ya que tiene una sensibilidad mayor que las técnicas parasitológicas clásicas. El papel de la RCP en la fase crónica de EC más discutido, ya que resulta positiva en 40-70% de los pacientes, dependiendo de los estudios, con una gran variabilidad dependiendo de diferentes factores: el grado de parasitemia del paciente, el volumen procesado de la muestra, la diana genética de la técnica en cuestión, las características de la población en la que se realiza y por las variaciones inter-DTU en la dosificación y/o secuencia de los blancos de amplificación (Lewis *et al.*, 2009). Por otro lado, un resultado negativo no excluye la infección (Brasil *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha demostrado la utilidad de esta técnica en casos crónicos de la enfermedad donde los resultados de serología no son concluyentes, en la detección de pacientes seronegativos con EC (Ministério da Saúde 2005; Batista *et al.*, 2010; Blum-Dominguez *et al.*, 2011) y cada vez está siendo más utilizada para monitorizar la eficacia del tratamiento y para la evaluación de nuevos tratamientos en ensayos clínicos, ya que la positividad de la técnica tras la finalización del tratamiento indicaría un fracaso terapéutico (Molina *et al.*, 2014; Morillo *et al.*, 2015).

El Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología (LNRP) ha deducido la necesidad de contar con herramientas moleculares que permitan, junto con las herramientas serológicas, complementar el algoritmo diagnóstico establecido para el diagnóstico de la tripanosomiasis americana. A tales efectos ha tenido como objetivo introducir los métodos moleculares más utilizados para su diagnóstico y futura comparación, así como la evaluación del algoritmo diagnóstico establecido para el diagnóstico. El blanco genético más utilizado es la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto, secuencia que tiene un alto número de copias en el genoma de *T. cruzi* (5.000 a 10.000 copias de ADNk) (Ávila *et al.*, 1991). Dentro de esta región se han diseñado juegos de cebadores para la región constante y para la región variable, obteniéndose mejores resultados de sensibilidad con los cebadores diseñados para la región variable entre los que se encuentran los cebadores 121-122

(Degrave *et al.*, 1988; Wincker *et al.*, 1994; Britto *et al.*, 1995) y S35-S36 (Sturm *et al.*, 1988; Ávila *et al.*, 1991; 1994). Una vez introducido en el LNRP la RCP que amplifica la región de 330 pb del ADN del kinetoplasto utilizando los cebadores 121 y 122, nos propusimos en este trabajo introducir el método basado en el juego de cebadores S35 y S36 con el objetivo final de introducir diferentes métodos de la RCP basado en diferentes secuencias dianas que permitan su futura comparación en un panel de muestras que se ira creando con el fin de determinar el método molecular con el que se obtengan los mejores valores de validez y seguridad diagnóstica.

El juego de cebadores S35-S36 se ha utilizado en el diagnóstico de *T. cruzi* en pacientes, vectores y reservorios (animales domésticos y salvajes) (Sturm *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1993; Kirchhoff *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2002; Virreira *et al.*, 2003; Chipman Trejo *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2007; Pavia *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2009; Reisenman *et al.*, 2010; Cominetti *et al.*, 2011; Pavia *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2013; Mubiro *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015), con la utilidad adicional de amplificar además el ADNk de *T. rangeli*, presentándose patrones de bandas que pueden distinguir entre ambos parásitos (Ávila *et al.*, 1993; Vallejo *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2002; Virreira *et al.*, 2003; Pavia *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2015). Sin embargo, la capacidad de estos cebadores de detectar los diferentes linajes de *T. cruzi*, así como la sensibilidad analítica a *T. rangeli* no ha sido verificada hasta el momento, de ahí que también fueron objeto de estudio en este trabajo.

La RCP permite la amplificación exponencial de secuencias específicas de ADN que pueden encontrarse en la muestra en mínimas cantidades, haciendo de esta técnica una herramienta útil para el diagnóstico, siempre y cuando se logre la normalización de los componentes de la reacción. Dicha normalización, constituye un elemento indispensable cuando esta herramienta se introduce por primera vez en un laboratorio con fines diagnósticos. Se normalizaron los parámetros de la reacción con ADN purificado, seleccionándose la concentración óptima de los principales componentes de la reacción: cebadores, cloruro de magnesio y Taq ADN polimerasa, elementos que influyen en la sensibilidad y especificidad de la prueba (Weiss, 1995).

La elección de los cebadores debe realizarse de forma cuidadosa y habitualmente, es el factor más crítico durante la amplificación. En este trabajo, los cebadores utilizados

presentan las características generales necesarias, como son su longitud (18 – 25 nucleótidos) y el contenido de Guanina y Citosina entre 40 al 60 %, distribuido de forma regular a lo largo de la secuencia. Su concentración es otro aspecto importante en la mezcla de reacción, pues bajas concentraciones disminuyen el rendimiento y aumentan la especificidad, mientras, concentraciones elevadas provocan lo contrario (Steffen *et al.*, 1999, Lorenz, 2012). En nuestro caso, se determinó como condición óptima 0,6µM.

La concentración de MgCl₂ es un aspecto importante en la mezcla de reacción y debe ser optimizado cuidadosamente pues diferentes concentraciones pueden conllevar a diferencias significativas en la eficiencia de las reacciones y el rendimiento de los productos de la RCP. Las ADN polimerasas termoestables requieren la presencia de magnesio para actuar como un cofactor durante el proceso de reacción. En ausencia de una adecuada cantidad de Mg²⁺ la enzima se inactiva, y no hay amplificación o hay un bajo rendimiento. Por otra parte, el exceso del mismo reduce la fidelidad de la enzima, e incrementa el número de amplificaciones inespecíficas, lo cual disminuye la fidelidad de la copia (Williams *et al.*, 1989; Eckert y Kundell, 1990; Ellsword *et al.*, 1993; Lorenz, 2012). La concentración de magnesio es uno de los reactivos más fáciles de manipular con el mayor impacto en la rigurosidad de la RCP. El rango de concentración recomendado debe estar entre 1- 4 mM, bajo las condiciones normales de reacción, y la concentración habitual, para 200 µM de dNTPs, en un rango de 2 ± 0,5 mM (Steffen, 1999, Lorenz, 2012). En este trabajo, la concentración óptima fue de 2,5 mM de MgCl₂.

La concentración de enzima (Taq ADN Polimerasa) es un factor importante a tener en cuenta en la RCP, debido a que tanto altas como bajas concentraciones respecto a la óptima, afectan la eficiencia de la reacción (Steffen *et al.*, 1999; Lorez, 2012). Para muchos ensayos la cantidad óptima se encuentra entre 0,5 y 2,5 U en 50 µL de volumen final de reacción. Concentraciones superiores disminuyen la especificidad, y se pueden generar artefactos relacionados con la actividad exonucleasa 5'- 3' (Longley *et al.*, 1990; Bell y De Marini, 1991). En nuestro caso, la concentración de 1 U para 25µL de reacción fue suficiente.

El resto de los componentes de la reacción, dNTPs y tampón de amplificación, se utilizaron a las concentraciones recomendadas. La concentración habitual para los

dNTPs es 200 μM , y es fundamental tener una concentración equimolar de los cuatro dNTPs, ya que el desequilibrio, disminuye el rendimiento y favorece la tasa de error de copia. La concentración del tampón de amplificación que se utilizó, fue la que recomiendan los fabricantes (Steffen, 1999; Lorez, 2012).

La eficacia de la unión de los cebadores es un factor muy importante para el éxito y la rigurosidad de la RCP y puede modificarse mediante factores como la constitución química del tampón (potenciadores de la RCP, codisolventes), concentración de cebadores, concentración de Mg_2^+ y temperatura de hibridación (Markoulatos *et al.*, 2002). La amplificación por la RCP debe optimizarse para alcanzar la temperatura hibridación más baja, donde la reacción sigue siendo específica y no se observan productos inespecíficos. Si la temperatura de hibridación es muy baja se amplifican fragmentos no específicos, si la temperatura de hibridación es muy alta, el rendimiento del producto deseado y, a veces, la pureza se reduce debido a la deficiencia de la unión de los cebadores (Lorenz, 2012). Como resultado del gradiente de temperaturas realizado en este estudio se definió 62°C como la temperatura óptima.

Luego de la selección del la secuencia blanco y cebadores a evaluar, fue imprescindible detectar la menor cantidad posible de parásitos que pudieran encontrarse en las muestras clínicas a ser analizadas. Una vez normalizados los parámetros de la RCP, se determinó la sensibilidad y especificidad analítica. Se ha reportado en la literatura que la RCP S35-S36 permite amplificar y detectar entre 0,01 – 10 fg de ADN de *T. cruzi* (Sturm *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 2009; Mubiru *et al.*, 2014) en un exceso de ADN humano (Sturm *et al.*, 1989; Fernández *et al.*, 2009). Al evaluar la sensibilidad analítica de la RCP utilizando ADN puro de los seis linajes de *T. cruzi* se obtuvo que la misma es capaz de detectar hasta 0,01pg de ADN (10fg) independiente del linaje, que es equivalente al ADN de un solo parásito considerando que el molde de 330pb del ADNk es aproximadamente 15fg (Centurion-Lara *et al.*, 1994). Demostrándose que los cebadores de ADNk pueden amplificar igualmente todos los linajes con muy alta sensibilidad analítica, aunque observamos como resultado amplicones de diferentes intensidades. Este constituye el primer estudio que evalúa la sensibilidad analítica de este juego de cebadores utilizando ADN procedente de cepas de los seis linajes del parásito, estudios anteriores se habían realizado con uno (Fernández *et al.*, 2009; Mubiru *et al.*, 2014) y tres linajes (Sturm *et al.*, 1989) obteniéndose los valores de sensibilidad analítica reportados.

De forma simultánea, la evaluación de la especificidad analítica mostró el reconocimiento y amplificación de la banda esperada para el ADN de *T. cruzi*, no así para los parásitos, bacterias, virus y hongos evaluados. Sin embargo, al estudiar otras especies de *Trypanosomas* se obtuvo la banda de amplificación de alrededor de 330pb en las subespecies de *T. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, *T. equiperdum*, *T. evansi*, así como *T. cruzi marinkellei* y *T. rangeli*. Es importante destacar que la figura muestra una banda de amplificación a 10ng de ADN del parásito y de forma general las bandas de amplificación obtenidas son tenues a esta cantidad de ADN, de ahí que a nuestro criterio no constituye un problema de especificidad de la técnica al ser utilizada en muestras clínicas, reservorios y vectores. La especificidad analítica de esta RCP había sido estudiada previamente por Sturm y colaboradores (1989) quien solo encontró la amplificación a *T. rangeli* al estudiar además de este parásito *Blastocrithidia culicis*, *Endotrypanum* spp, *Leishmania tarantolae* y *Leptomonas allosoma*. Sin embargo, Chipman Trejo y colaboradores (2006) amplificaron *L. braziliensis* utilizando este mismo juego de cebadores. No existen reportes anteriores de la evaluación analítica de esta RCP en otras especies de parásitos de la misma familia u otras familias hasta el descrito en este trabajo. Estudios futuros podrían conducir a demostrar quizás la capacidad de detección de otras especies de *Trypanosoma* (Ej: *T. vivax*), que aquí amplifican a una concentración de 10 ng con el fin de verificar su posible uso en el diagnóstico de estos parásitos.

Una vez normalizada la técnica y demostrado además su repetibilidad y reproducibilidad se paso a demostrar la potencialidad de la misma para diferenciar *T. cruzi* y *T. rangeli* basado en el resultado de amplificación, previamente descrito por Vallejo y colaboradores (1999) y que ha sido utilizado por varios autores para detectar y diferenciar *T. cruzi* y *T. rangeli* a partir de muestras de pacientes, vectores y reservorios (murciélagos) (Vallejo *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2002; Gil *et al.*, 2007; Pavia *et al.*, 2007; 2011; Pinto *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha descrito que *T. rangeli* es enmascarado en el perfil de amplificación de *T. cruzi* en el caso de infecciones mixtas en vectores (Vargas *et al.*, 2000). Ramirez y colaboradores (2002) detectaron *T. cruzi* y *T. rangeli* en un área endémica de Brasil, el uso de los cebadores S35-S36 en parásitos aislados en cultivo mostró que en 11% de las muestras, los perfiles de *T. rangeli* enmascararon a *T. cruzi* y en igual porcentaje a la inversa. En nuestro estudio al evaluar un grupo de aislamientos de cada una de las

especies se obtuvieron patrones diferentes entre ambas especies, como había sido descrito anteriormente por Vallejo y colaboradores (1999). Sin embargo, al determinar la sensibilidad analítica en dos de las cepas de *T. rangeli* se demostró que la técnica es capaz de detectar entre 1 y 0,1ng de parásito lo que representa muy poca sensibilidad analítica lo que dificulta la detección de *T. rangeli* en muestras de pacientes, vectores o reservorios y de infecciones mixtas en vectores naturalmente infectados.

Hoy continúa la necesidad de contar con un diagnóstico diferencial preciso para *T. cruzi* y *T. rangeli* (Thekisoë *et al.* 2010), de ahí de que en futuras investigaciones diseñemos y evaluemos métodos que nos permitan detectar y diferenciar estas especies de parásitos con el fin de incluirlas en los algoritmos diagnósticos. Teniendo en cuenta que las infecciones con cada una de estas especies e infecciones mixtas con *T. cruzi* y *T. rangeli* se han reportado en humanos, vectores y reservorios animales (Guhl *et al.*, 1987; Coura *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 2000; Ramirez *et al.* 2002; Chiurillo *et al.* 2003; Dias *et al.* 2007; Pavia *et al.* 2007; Thekisoë *et al.* 2010; Saldaña *et al.* 2012, Grijalva *et al.*, 2012; Xavier *et al.*, 2014).

Varios investigadores han demostrado que los cebadores S35-S36 tienen gran utilidad para la detección de *T. cruzi* en humanos, vectores y reservorios (Sturm *et al.*, 1989; Ávila *et al.*, 1993; Kirchhoff *et al.*, 1996; Vallejo *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 2000; Ramirez *et al.*, 2002; Virreira *et al.*, 2003; Chipman Trejo *et al.*, 2006; Gil *et al.*, 2007; Pavia *et al.*, 2007; Fernández *et al.*, 2009; Reisenman *et al.*, 2010; Cominetti *et al.*, 2011; Pavia *et al.*, 2011; Fernandes *et al.*, 2013; Mubiro *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2015). En el caso específico de los humanos, se ha utilizado para detectar la presencia del parásito en pacientes en fase crónica o para la evaluación del tratamiento con benznidazole o nifurtimox (Ávila *et al.*, 1993; Britto *et al.*, 1995; Wincker *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 2009).

Es así como la RCP S35-S36 en nuestro estudio fue capaz de detectar 86,40% de los individuos serológicamente positivos en fase crónica indeterminada, porcentaje similar (86,70%) al descrito por Fernández y colaboradores (2009) en un estudio llevado a cabo en 240 individuos seropositivos en Rio Grande do Sul (Brasil) utilizando este juego de cebadores. Sin embargo, porcentajes superiores de positividad por la RCP (100% sensibilidad diagnóstica) en pacientes crónicos han sido descritos con un número menor de pacientes (114), en este trabajo los productos de amplificación son

sometidos a un paso posterior de hibridación con un cebador interno dentro de la secuencia amplificada (Ávila *et al.*, 1993).

En este estudio, el 13,6% de los individuos seropositivos (3 pacientes) no fue detectado a pesar de que se descartó la presencia de inhibición de la RCP. Estos resultados pueden deberse a alguna de las siguientes razones o a una combinación de las mismas: (i) niveles escasos de parasitemia, de forma que en 200µL de la muestra no estuviera presente ningún parásito; (ii) intermitencia en la parasitemia, o (iii) presencia de falsos positivos en las pruebas serológicas posiblemente por reacción cruzada con otros tripanosomátidos como *Leishmania* spp. y *T. rangeli* (Junqueira *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 2002; Marcon *et al.*, 2002).

Dentro del grupo de personas serológicamente negativos (48 personas), se detectó en un caso la presencia de *T. cruzi* por la técnica de la RCP. Este paciente cubano tenía como antecedentes haber permanecido en áreas endémicas y presentaba síntomas cardiacos. Estos resultados fueron corroborados mediante otros métodos moleculares utilizando otra región del ADNk (juego de cebadores 121/122; Gomes *et al.*, 1998) y además de otros dos métodos moleculares basados en el gen que codifica la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*) (RCP *hsp70* TcTr y la RCP-RFLP *hsp70* T; Fraga *et al.*, 2014), manteniendo las condiciones estrictas para evitar las contaminaciones en el laboratorio. Este paciente resultó serológicamente negativo por los tres métodos utilizados en este estudio (UMELISA® CHAGAS (Centro de Inmunoensayo, Cuba); SmartTest ELISA Ab (SmartTest, Diagnostics, Iran) y la tira rápida SD Chagas Ab Rapid (Standar Diagnostic, INC, Korea)).

Previamente se ha reportado pacientes chagásicos sintomáticos y asintomáticos con pruebas de la RCP positivas y serologías negativas (Ávila *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 1999; Castro *et al.*, 2002; Salomone *et al.*, 2003; Gutierrez *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 2010; Schitman *et al.*, 2011), inclusive se ha demostrado la presencia de pacientes que se mantienen serológicamente negativos durante toda la vida (Camargo *et al.*, 1992).

Este problema ha sido ignorado en gran medida en el entorno clínico (Salomone *et al.*, 2003). Se han propuesto varios argumentos para explicar esta controvertida situación. La infección reciente de personas altamente expuestas a transmisión vectorial que aún no ha sido reconocida por el sistema inmune es una posible explicación. Sin embargo,

la infección aguda no es un evento frecuente en nuestra población de estudio debido a la edad y porque la población urbana rara vez está expuesta a la reinfección vectorial. Alternativamente, se podría especular que las muestras positivas podrían haberse contaminado con ADN, pero esta teoría ha sido desatendida por muchos autores al demostrar la validez de los procedimientos. Finalmente, *T. cruzi* puede infectar crónicamente a algunos pacientes, pero una respuesta humoral puede no desarrollarse o ser detectada mediante pruebas serológicas convencionales. Al abordar este punto, Castro y colaboradores (2002) observaron que 80% de los pacientes con la RCP positivos pero seronegativos tenían anticuerpos líticos contra *T. cruzi* mediante una prueba de lisis mediada por complemento. Del mismo modo, Leguizamón y colaboradores (1997) informaron pacientes que eran seropositivos para EC solo por ensayo de inhibición de la transamidasa, pero negativos con las pruebas serológicas convencionales. De lo contrario, independientemente de su causa, es necesario considerar las consecuencias clínicas y diagnósticas de este fenómeno (Salomone *et al.*, 2003). Este hallazgo desafía las recomendaciones actuales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la terapia y las políticas de transfusión sanguínea y avala la necesidad de contar con métodos moleculares en los algoritmos diagnósticos establecidos en los países.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que el LNRP del IPK cuenta con un método de la RCP que permite amplificar una región de 330pb del ADNk que permite la detección de *T. cruzi* en muestras de pacientes.

Finalmente, se considera necesario encausar nuevos estudios que permitan proponer métodos moleculares con alta sensibilidad y especificidad que permitan a su vez diferenciar *T. cruzi* y *T. rangeli* en muestras de pacientes en las diferentes fases clínicas de la enfermedad, así como en vectores y reservorios con el propósito de actualizar y proponer un algoritmo diagnóstico más efectivo.

7. CONCLUSIONES

1. Se logró normalizar la técnica de la RCP ADNk (S35-S36) para el diagnóstico de *T. cruzi*.
2. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ADNk (S35-S36) mostró alta sensibilidad analítica para los seis linajes de *T. cruzi*, así como una buena especificidad con resultados satisfactorios de repetibilidad y reproducibilidad.
3. La técnica permite diferenciar entre las cepas de *T. cruzi* y *T. rangeli*, no obstante debido a la baja sensibilidad analítica encontrada para *T. rangeli*, no se recomienda su uso en la detección y diferenciación a partir de muestras clínicas.
4. La técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa ADNk (S35-S36) puede ser utilizada para la detección de *T. cruzi* en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK a partir de muestras clínicas.

8. RECOMENDACIONES

1. Comparar los métodos de la RCP introducidos y diseñados por el LNRP-IPK con el objetivo de determinar con cual de ellos se obtienen los mejores valores de sensibilidad y especificidad diagnóstica para la Enfermedad de Chagas.
2. Diseñar y evaluar nuevos métodos moleculares que permitan la detección y diferenciación de *T. cruzi* y *T. rangeli* en muestras clínicas, vectores y reservorios.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar HM, Abad-Franch F, Dias JC, Junqueira AC, Coura JR. Chagas disease in the Amazon region. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 47-56.
- Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: sensitivity and specificity. *BMJ* 1994a; 308: 1552.
- Altman DG, Bland JM. Statistics Notes: Diagnostic tests 1: predictive values. *BMJ* 1994b; 309: 102.
- Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AA, Vilas-Boas F, Oliveira GM, Bacal F, *et al.* I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. *Arq Bras Cardiol* 2011; 97:1-48.
- Apt B Werner, Heitmann G Ingrid, Jercic L M. Isabel, Jofré M Leonor, Muñoz C. del V Patricia, Noemí H Isabel, *et al.* Guías clínicas de la enfermedad de Chagas: Parte II. Enfermedad de Chagas en el adulto, la infancia y adolescencia. *Rev Chil Infectol* 2008; 25: 194-199.
- 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.
- Ayala, F.J. 1993. *Trypanosoma* and *Leishmania* have clonal population structures of epidemiological significance. *Biol Res* 26(1-2): 47-63.
- Barnabé C, Brisse S, Tibayrenc M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. *Parasitology* 2000; 120:513-26.
- 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).

- Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SC. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *Int J Infect Dis* 2010; 14:e974-7.
- Bell DA, De Marini DM. Excessive cycling converts PCR products to random length higher molecular fragments. *Nucleic Acid Res* 1991; 19:5079.
- Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A, Jr., Marin-Neto JA, Dantas RO, *et al.* Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *JAMA* 2007; 298: 2171-81.
- Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21:476-82.
- Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2009; 49: e52-4.
- Bittencourt LA, Carvalhal SS, Miguel A Jr. [Electrocardiographic signs of apical lesions in Chagas' heart disease]. *Arq Bras Cardiol* 1975; 28:437-42.
- Blum-Domínguez S, Espinoza B, Martínez-Martínez I, Maldonado-Velázquez G, Tamay-Segovia P. [A *Trypanosoma cruzi* infection without serologic evidence]. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2011; 49:537-9.
- Bosseno MF, Telleria J, Vargas F, Yaksic N, Noireau F, Morin A, *et al.* *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.
- Brasil PE, Castro R, Castro Ld. Commercial enzymelinked immunosorbent assay versus polymerase chain reaction for the diagnosis of chronic Chagas disease: a systematic review and metaanalysis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111:119.
- 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.
- Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2^o Edição. Guanabara Koogan Ed. Rio de Janeiro, Brasil. 2000. 431 p.
- 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.

- Breniere 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.
- Breniere 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.
- Breniere SF, Morochi W, Bosseno MF, Ordonez J, Gutierrez T, Vargas F, *et al.* *Trypanosoma cruzi* genotypes associated with domestic *Triatoma sordida* in Bolivia. *Acta Trop* 1998; 71: 269-83.
- Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004792.
- Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol* 2000; 111: 95-105.
- Britto C, Cardoso MA, Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, *et al.* Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995; 110: 241-7.
- Broutin H, Tarrieu F, Tibayrenc M, Oury B, Barnabe C. Phylogenetic analysis of the glucose-6-phosphate isomerase gene in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2006; 113: 1-7.
- Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, *et al.* 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: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; 106:623-8.
- Burleigh BA, Woolsey AM. Cell signalling and *Trypanosoma cruzi* invasion. *Cell Microbiol* 2002; 4: 701-11.

- 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.
- Camargo ED, Nakamura PM, Vaz AJ, da Silva MV, Chieffi PP, de Melo EO. Standardization of dot-ELISA for the serological diagnosis of toxocariasis and comparison of the assay with ELISA. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1992; 34:55-60.
- Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999; 94 Suppl 1:331-5.
- Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Bula I, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion* 2015; 55:1249-55.
- Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2002; 88:894-900.
- Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 2002; 88:894-900.
- Cavazzana Jr M, Marcili A, Lima L, da Silva FM, Junqueira AC, Veludo HH, *et al.* Phylogeographical, ecological and biological patterns shown by nuclear (ssrRNA and gGAPDH) and mitochondrial (Cyt b) genes of trypanosomes of the subgenus *Schizotrypanum* parasitic in Brazilian bats. *Int. J. Parasitol* 2010; 40, 345–355.
- Centurion-Lara A, Barrett L, Van Voorhis WC. Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction amplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 1994; 170:1334-9.
- Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des Devel Ther* 2015; 9:4807-23.
- Chiaramonte 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: 295-308.
- Chin-Hong PV, Schwartz BS, Bern C, Montgomery SP, Kontak S, Kubak B, *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; 11:672-80.
- Chipman Trejo, S.M. Polymerase chain reaction (PCR) evaluation of three primer pairs for detection of *Trypanosoma cruzi* (Chagas Disease) in clinical samples. *St Martin Univ Biol J* 2006; 1: 185-200.
- Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, *et al.* Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clinical and Diagnostic Laboratory and Immunology* 2003; 10: 775–779.
- Cicora F, Escurra V, Bibolini J, Petroni J, Gonzalez I, Roberti J. Cerebral trypanosomiasis in a renal transplant recipient. *Transpl Infect Dis.* 2014; 16:813–7.
- Cominetti MC, Andreotti R, Oshiro ET, Dorval ME. Epidemiological factors related to the transmission risk of *Trypanosoma cruzi* in a Quilombola community, State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2011;44: 576-81.
- Corredor Arjona A, Alvarez Moreno CA, Agudelo CA, Bueno M, Lopez MC, Caceres E, *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* infection and risk factors in a Colombian indigenous population. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 1999; 41: 229-34.
- Coura JR, Fernandes O, Arboleda M, *et al.* Human infection by *Trypanosoma rangeli* in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 278–279.
- Coura JR. Special issue on Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110:275-6.
- Cuba Cuba A. Review of the biologic and diagnostic aspects of *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli*. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998; 31: 207-20.
- Cura CI, Mejia-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal MV, *et al.* *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol*; 40: 1599-607.
- de Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, *et al.* Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5:e1277.
- De Geer, C. Memories pour servir a la histoire des insectes. Vol 3, Pierre Hesselberg Stockolm. 1773; 696.

- Degrave W, Fragoso SP, Britto C, van Heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, *et al.* Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27: 63-70.
- 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 JC. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 11-8.
- 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.
- Dvorak, J.A. 1984. The natural heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: biological and medical implications. *J Cell Biochem* 24(4):357-371.
- Eckert K, Kundel T. High fidelith DNA synthesis by the thermus aquaticus DNA polimerase. *Nucleic Acid Res* 1990; 18:3739-44.
- Ellsworth D, Rittenhouse K, Honeycutt R. Artifactual variation in Randomly Amplified Polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 1993; 14:214-7.
- Fabbro DL, Danesi E, Olivera V, Codebó MO, Denner S, Heredia C, *et al.* Trypanocide treatment of women infected with *Trypanosoma cruzi* and its effect on preventing congenital Chagas. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8:e3312.
- Fabbro DL, Streiger ML, Arias ED, Bizai ML, del Barco M, Amicone NA. Trypanocide treatment among adults with chronic Chagas disease living in Santa Fe city (Argentina), over a mean follow-up of 21 years: parasitological, serological and clinical evolution. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40:1-10.
- Fernandes CD, Tiecher FM, Balbinot MM, Liarte DB, Scholl D, Steindel M, Romanha A. Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:27-32.
- Fernandes MC, Flannery AR, Andrews N, Mortara RA. Extracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* are potent inducers of phagocytosis in mammalian cells. *Cell Microbiol* 2013; 15:977-91.

- Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin (Barc)*. 2017; 148:125-131.
- 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, Fernández-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.
- Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Chatelain E, Kelly JM. Reply to "Drug Susceptibility of Genetically Engineered *Trypanosoma cruzi* Strains and Sterile Cure in Animal Models as a Criterion for Potential Clinical Efficacy of Anti-T. *cruzi* Drugs". *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:7925.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 2010; 115:22-7.
- Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop* 2010; 115: 22-7.
- 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.
- Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60:205-10.
- Gomes ML, Macedo AM, Vago AR, Pena SD, Galvão LM, Chiari E. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp Parasitol* 1998; 88:28-33.
- Gomes YM, Lorena VM, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 115-21.
- Grijalva MJ, Suarez-Davalos V, Villacis AG, Ocaña-Mayorga S, Dangles O. Ecological factors related to the widespread distribution of sylvatic *Rhodnius ecuadoriensis* populations in southern Ecuador. *Parasit Vectors* 2012; 13: 5:17.
- Guerra-Guttenberg RA, Grana DR, Ambrosio G, Milei J. Chagas cardiomyopathy: Europe is not spared! *Eur Heart J* 2008; 29: 2587-91.

- Guhl F, Aguilera G, Pinto N, Vergara D. Updated geographical distribution and ecoepidemiology of the triatomine fauna (Reduviidae: Triatominae) in Colombia. *Biomedica* 2007; 27: 143-62.
- Guhl F, Hudson L, Marinkelle CJ, Jaramillo CA, Bridge D. Clinical *Trypanosoma rangeli* infection as a complication of Chagas' disease. *Parasitology* 1987; 94: 475–484.
- 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, Vallejo GA. *Trypanosoma* (Herpetosoma) *rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003; 98: 435-42.
- Gurevitz JM, Gaspe 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; 7:e2158.
- Gutierrez R, Angulo VM, Tarazona Z, Britto C, Fernandes O. Comparison of four serological tests for the diagnosis of Chagas disease in a Colombian endemic area. *Parasitology* 2004; 129:439-44.
- Hamilton, P.B., Stevens, J.R., Gaunt, M.W., Gidley, J., Gibson, W.C. Trypanosomes are monophyletic: evidence from genes for glyceraldehyde phosphate dehydrogenase and small subunit ribosomal RNA. *Int. J. Parasitol* 2004; 34, 1393–1404.
- Hecht MM, Nitz N, Araujo PF, Sousa AO, Rosa Ade C, Gomes DA, Leonardecz E, Teixeira AR. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. *PLoS One*. 2010; 5:e9181.
- 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 C, Guhl F, Falla A, Fajardo A, Montilla M, Adolfo Vallejo G, *et al.* Genetic Variability and Phylogenetic Relationships within *Trypanosoma cruzi* I Isolated in Colombia Based on Miniexon Gene Sequences. *J Parasitol Res* 2009; 2009:897364.
- Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14:659-88.
- Hoare, C.A. *The Trypanosomes of Mammals*. Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1972.

- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: e300.
- 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; 121:22-33.
- Hughes, A.L., 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, 2001–2011. *Am J Transplant.* 2013;13: 2418–25.
- Imaz-Iglesia I, Miguel LG, Ayala-Morillas LE, García-Pérez L, González-Enríquez J, Blasco-Hernández T, *et al.* Economic evaluation of Chagas disease screening in Spain. *Acta Trop* 2015;148:77-88.
- 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:e69-75.
- Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1996; 90: 129-32.
- 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.* Chagas Disease in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis* 2009; 48:1534-40.
- Leguizamón MS, Russomando G, Luquetti A, Rassi A, Almirón M, González-Cappa SM, *et al.* Long-lasting antibodies detected by a trans-sialidase inhibition assay

- of sera from parasite-free, serologically cured chagasic patients. *J Infect Dis* 1997; 175:1272-5.
- 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.
- Lewicka K, Breniere-Campana SF, Barnabe C, Dedet JP, Tibayrenc M. An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. *Exp Parasitol* 1995; 81: 20-8.
- 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.
- Lima L, Espinosa-Álvarez O, Pinto CM, Cavazzana M Jr, Pavan AC, Carranza JC, Lim BK, *et al.* New insights into the evolution of the *Trypanosoma cruzi* clade provided by a new trypanosome species tightly linked to Neotropical Pteronotus bats and related to an Australian lineage of trypanosomes. *Parasit Vectors* 2015; 8:657.
- Lima L, Silva FM, Neves L, Attias M, Takata CS, Campaner M, *et al.* Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma (Schizotrypanum) erneyi* sp. nov., in African bats closely related to *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* and allied species. *Protist* 2012; 163:856-72.
- Lima L, Espinosa-Alvarez O, Hamilton PB, Neves L, Takata CS, Campaner M, *et al.* *Trypanosoma livingstonei*: a new species from African bats supports the bat seeding hypothesis for the *Trypanosoma cruzi* clade. *Parasit Vectors* 2013; 6, 221.
- Liu Q, Zhou XN. Preventing the transmission of American trypanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infect Dis Poverty* 2015; 28;4:60.
- 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.
- Longley MS, Bennett SE, Mosbaug DW. Characterization of the 5' to 3' exonuclease associated with *Thermus aquaticus* RNA polymerase. *Nucleic Acid Res* 1990; 18: 7317-22.

- Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp* 2012; 22:e3998.
- 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; 110:369-76.
- 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.
- 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;136:641-55.
- Marcon GE, Andrade PD, de Albuquerque DM, Wanderley Jda S, de Almeida EA, Guariento ME, Costa SC. Use of a nested polymerase chain reaction (N-PCR) to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients and patients with doubtful serologies. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 43:39-43.
- Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *J Clin Lab Anal* 2002; 16:47-51.
- Martínez I, Cervantes-Landín A, Espinoza B. [Molecular diagnosis of Chagas disease]. *Gac Med Mex* 2013; 149:363-5.
- Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian Consensus on Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38: 7–29 (in Portuguese).
- Molina I, Gómez Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 2014; 370:1899-908.
- 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; 59:6125-31.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. [Update Chagas disease]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2016; 34:132-8.
- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol* 2006; 100: 663-77.

- Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 17-30.
- 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: 1295-306.
- 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: 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.
- Mubiru JN, Yang A, Dick EJ Jr, Owston M, Sharp RM, VandeBerg JF, *et al.* Correlation between presence of *Trypanosoma cruzi* DNA in heart tissue of baboons and cynomolgus monkeys, and lymphocytic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg* 2014; 90:627-33.
- Murcia L, Carrilero B, Munoz-Davila MJ, Thomas MC, López MC, Segovia M. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. *Clin Infect Dis* 2013; 56:496-502.
- 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.
- Neiva A. Contribuição para o estudo dos hematofagos brasileiros e descrição de uma nova espécie de Triatoma. *Brazil-Médico* 1911; 25: 461-462.
- 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.
- Pavía PX, Roa NL, Uribe AM, Puerta CJ. [Using S35-S36 and TcH2AF-R primer-based PCR tests to follow-up a Chagas' disease patient who had undergone a heart transplant]. *Biomedica* 2011; 31:178-84.
- Pavía PX, Vallejo GA, Montilla M, Nicholls RS, Puerta CJ. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection in triatomine vectors by amplification of the histone H2A/SIRE and the sno-RNA-C11 genes. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2007; 49:23-30.

- Pereira PC, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venomous Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2013;19:34.
- Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 2018; 391:82-94.
- Pérez-Molina JA, Norman F, López-Vélez R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14:263-74
- 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; 64:1139-47.
- 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; 57:390-5.
- Pinto A, Pett S, Jackson Y. Identifying Chagas disease in Australia: an emerging challenge for general practitioners. *Aust Fam Physician* 2014; 43:440-2.
- 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.
- Pinto CM, Ocaña-Mayorga S, Tapia EE, Lobos SE, Zurita AP, Aguirre-Villacís F, *et al*. Bats, Trypanosomes, and Triatomines in Ecuador: New Insights into the Diversity, Transmission, and Origins of *Trypanosoma cruzi* and Chagas Disease. *PLoS One* 2015; 10:e0139999.
- Ponce C. Current situation of Chagas disease in Central America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 41-4.
- Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, Zingales B. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop* 2002; 84:189-98.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010; 375:1388-402.
- Rassi A, Jr., Dias JC, Marin-Neto JA, Rassi A. Challenges and opportunities for primary, secondary, and tertiary prevention of Chagas' disease. *Heart* 2009; 95: 524-34.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 2010; 26: 275-91.

- Reisenman CE, Lawrence G, Guerenstein PG, Gregory T, Dotson E, Hildebrand JG. Infection of kissing bugs with *Trypanosoma cruzi*, Tucson, Arizona, USA. *Emerg Infect Dis* 2010;16:400-5.
- 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-Mendez A, Albajar-Vinas P, Angheben A, Chiodini P, Gascon J, Munoz J, *et al.* Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8:e3245
- 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; 29:561-7.
- 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; 86:412-6.
- Rueda K, Trujillo JE, Carranza JC, Vallejo GA. [Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries]. *Biomedica* 2014; 34:631-41.
- 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.
- Saldaña A, Martinez I, Santamaria G, Santamaria AM, Miranda A, Calzada JE. A new endemic focus of Chagas disease in the northern region of Veraguas Province, Western Half Panama, Central America. *PLoS One* 2012; 7: e34657.
- Salomone OA, Basquiera AL, Sembaj A, Aguerri AM, Reyes ME, Omelianuk M, *et al.* *Trypanosoma cruzi* in persons without serologic evidence of disease, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:1558-62.
- Salvador R, Aridgides D, PereiraPerrin 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: 122–30.
- 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 nonendemicity. *J Clin Microbiol* 2014; 52:2506-12.
- 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; 52:441-9.
- 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.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop* 2010; 115:14-21.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 Suppl 1: 75-85.
- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007; 30; 102:75-85.
- 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.
- Sguassero Y, Cuesta CB, Roberts KN, Hicks E, Comandé D, Ciapponi A, Sosa-Estani S. Course of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. *PLoS One* 2015; 10:e0139363.
- Shikanai Yasuda MA, Albajar Viñas P. Endemic diseases: globalization, urbanization, and immunosuppression. *J Trop Med* 2013; 2013:390986.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* 2012; 54:845-52.
- Simpson AG, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol* 2006; 22, 168–174.
- 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: 141-52.
- 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.
- Steffen C, Ankenbaver W, Poaver-Hofmann R, Bye S, Eisen D, Frey B, *et al.* En: Steffen C, ed. *PCR Application Manual*. 2nd ed. Mannheim: Roche Diagnostics 1999. p.10.
- Stevens JR, Gibson WC. The evolution of pathogenic trypanosomes. *Cad Saude Publica* 1999; 15:673-84.
- Stevens J, Rambaut A. Evolutionary rate differences in trypanosomes. *Infect Genet Evol* 2001; 1: 143–150.
- Stevens JR. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. *Parasite* 2008; 15, 226–232.
- Stevens JR, Gibson W. The molecular evolution of trypanosomes. *Parasitol. Today* 1999; 15, 432–437.
- Stimpert KK, Montgomery SP. Physician awareness of Chagas disease, USA. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:871-2.
- Streiger ML, del Barco ML, Fabbro DL, Arias ED, Amicone NA. [Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2004; 37:365-75.
- 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: 205-14.
- Thekisoie OM, Rodriguez CV, Rivas F. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010; 82: 855–860.
- Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 115-9. .
- Tibayrenc M. Integrated genetic epidemiology of infectious diseases: the Chagas model. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998; 93: 577-80.
- Tibayrenc M. Modelling the transmission of *Trypanosoma cruzi*: the need for an integrated genetic epidemiological and population genomics approach. *Adv Exp Med Biol* 2010; 673:200-11.

- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol* 2001; 31: 472-81.
- Usinger RL. The Triatominae of North and Central America and West Indies and their public health significance. *Public Health Bull* 1944; 288.
- 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.
- 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. pallescens* and *R. prolixus* in Colombia. *Infect Genet Evol* 2003; 3: 39-45.
- Vallejo GA, Guhl F, Chiari E, Macedo AM. Species specific detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in vector and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA. *Acta Trop* 1999; 72:203-12.
- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae-*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector-parasite interactions. *Acta Trop* 2009; 110: 137-47.
- Vallejo M, Montenegro P, Reyes PA. [How much does the medical treatment of chronic Chagas cardiopathy cost? Direct costs in a cardiology hospital]. *Arch Cardiol Mex* 2002; 72:129-37.
- Vargas N, Souto RP, Carranza JC, Vallejo GA, Zingales B. Amplification of a specific repetitive DNA sequence for *Trypanosoma rangeli* identification and its potential application in epidemiological investigations. *Exp Parasitol* 2000; 96: 147-59.
- 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.
- Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, *et al.* Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006; 144:724-34.
- Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 2003; 68: 574-82.

- Votýpka, J., d'Avila-Levy, C.M., Grellier, P., Maslov, D.A., Lukeš, J., Yurchenko, V. New approaches to systematics of Trypanosomatidae: criteria for taxonomic (re)description. *Trends Parasitol* 2015; 31:460–469.
- Weiss JB. DNA probes and PCR diagnosis of parasitic infections. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 313-30.
- Westenberger SJ, Barnabe C, Campbell DA, Sturm NR. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Genetics* 2005; 171: 527-43.
- WHO. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* 2015; 90: 33–43.
- WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2010. Geneva: World Health Organization, 2010.
- WHO. First WHO report on neglected tropical diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO/HTM/NTD/2015. Geneva: World Health Organization, 2017.
- Williams JF. Optimization strategies for the Polimerasa Chain Reaction. *Biotechniques* 1989; 7:762-9.
- Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51: 771-7.
- Xavier SC, Roque AL, Bilac D, de Araújo VA, da Costa Neto SF, Lorosa ES, *et al.* Distantiae transmission of *Trypanosoma cruzi*: a new epidemiological feature of acute Chagas disease in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8:e2878.
- Yamagata Y, Nakagawa J. Control of Chagas disease. *Adv Parasitol*. 2006; 61:129–65.
- Zeledon R, Ponce C, Mendez-Galvan JF. Epidemiological, social, and control determinants of Chagas disease in Central America and Mexico--group discussion. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 45-6.
- 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. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta*

Trop 2017; Sep 21. pii: S0001-706X(17)30426-6. doi:
10.1016/j.actatropica.2017.09.017.

Zulantay I, Apt W, Ramos D, Godoy L, Valencia C, Molina M, *et al.* The epidemiological relevance of family study in Chagas disease. PLoS Negl Trop Dis 2013; 7:e1959.

Anexo 1. Lista de especies válidas de *Triatominae* y su respectiva clasificación en grupos y complejos

Tribus	Género	Grupo	Complejo	Subcomplejo	Especies
Alberproseniini	Alberprosenia				<i>goyovargasi</i> , <i>malheiroi</i> ^b
Bolboderini	Belminus				<i>corredori</i> ^b , <i>costaricensis</i> , <i>ferroae</i> ^b , <i>herreri</i> ^{b,c} , <i>laportei</i> , <i>peruvianus</i> ^b , <i>pittieri</i> , <i>rugulosus</i>
	Bolbodera				<i>scabrosa</i>
	Microtriatoma				<i>borba</i> ^c , <i>trinidadensis</i> ^b
	Parabelminus				<i>carioca</i> ^c , <i>yurupucu</i>
Cavernicolini	Cavernicola				<i>lenti</i> , <i>pilosa</i> ^b
Rhodniini	Pasmolestes				<i>arthuri</i> , <i>coreodes</i> ^b , <i>tertius</i>
	Rhodnius	prolixus			<i>barretti</i> , <i>dalessandroi</i> , <i>domesticus</i> ^b , <i>milesi</i> , <i>marabaensis</i> , <i>montenegrensensis</i> , <i>nasutus</i> ^{b,c} , <i>neglectus</i> ^{b,c} , <i>neival</i> ^{b,c} , <i>prolixus</i> ^{b,c} , <i>robustus</i> ^{b,c}
		pictipes			<i>amazonicus</i> , <i>brethesi</i> , <i>paraensis</i> , <i>pictipes</i> ^b , <i>stali</i> ^{b,c} , <i>zeledoni</i>
		pallescens			<i>colombiensis</i> ^c , <i>ecuadoriensis</i> ^{b,c} , <i>pallescens</i> ^{b,c}
Triatomini	Dipetalogaster				<i>maxima</i> ^c
	Eratyrus				<i>cuspidatus</i> ^{b,c} , <i>mucronatus</i> ^b
	Hermanlenticia				<i>matsunoi</i>
	Linshcosteus				<i>carnifex</i> , <i>chota</i> , <i>confumus</i> , <i>costalis</i> , <i>kali</i> , <i>karupus</i>
	Panstrongylus				<i>china</i> ^{b,c} , <i>diasi</i> , <i>geniculatus</i> ^{b,c} , <i>guentheri</i> ^{b,c} , <i>hispaniolae</i> ^a , <i>howardi</i> ^{b,c} , <i>humeralis</i> ^{b,c} , <i>lenti</i> ,

Anexos

					<i>lignarius^{b,c}, lutzii^b, megistus^{b,c}, mitarakaensis, rufotuberculatus^{b,c}, sherlocki, tupynamba^b</i>	
	ParaTriatoma				<i>hirsuta^b</i>	
	Triatoma				<i>dominicana^a</i>	
		rubrofasciata	phyllosoma (Meccus)	dimidiata	<i>dimidiata^{b,c}, hegneri^c, brailovskyi, gomeznunezi</i>	
				phyllosoma	<i>bassolsae^{b,c}, bolivari^{b,c}, longipennis^c, mazzottii^{b,c}, mexicana, pallidipennis^{b,c}, phyllosoma^{b,c}, picturata^{b,c}, ryckmani,</i>	
			flavida (NesoTriatoma)		<i>flavida^b, bruneri, obscura</i>	
			rubrofasciata		<i>amicitiae, bouvieri, cavernicola, leopoldi, migrans, pugasi, rubrofasciata^{b,c}, sinica</i>	
			protracta		<i>barberi^{b,c}, incrassata, neotomae^c, nitida^{b,c}, peninsularis^c, protracta^{b,c}, sinaloensis^c</i>	
			lecticularia		<i>gerstaeckeri^c, indictiva, lecticularia^{b,c}, recurva^c, rubida^c, sanguisuga^{b,c}</i>	
			dispar	dispar	<i>boliviana^b, carrioni^c, dispar^c, nigromaculata^{b,c}, venosa^c</i>	
			infestans	infestans	brasiliensis	<i>bahiensis, brasiliensis^{b,c}, juazeirensis^b, melanica, melanocephala^{b,c}, petrochiae, lenti^c, sherlocki (tibiamaculata?^c) (vitticeps?^{b,c})</i>

Anexos

				infestans	<i>delponte</i> ^c , <i>infestans</i> ^{b,c} , <i>platensis</i> ^{b,c}
				maculata	<i>arthurneivai</i> , <i>maculata</i> ^{b,c} , <i>pseudomaculata</i> ^{b,c} , <i>wygodzinskyi</i>
				matogrossensis	<i>baratai</i> , <i>costalimai</i> ^{b,c} , <i>deaneorum</i> ^b , <i>guazu</i> , <i>jatai</i> , <i>jurbergi</i> ^c , <i>matogrossensis</i> ^b , <i>vandae</i> ^{b,c} , <i>williami</i> ^{b,c}
				rubrovaria	<i>carcavallo</i> ^b , <i>circummaculata</i> ^c , <i>klugi</i> , <i>limai</i> , <i>oliveirai</i> , <i>pintodiasi</i> , <i>rubrovaria</i> ^{b,c} ,
				sordida	<i>garciabesi</i> ^b , <i>guasayana</i> ^{b,c} , <i>patagonica</i> ^{b,c} , <i>sordida</i> ^{b,c}
			spinolai (Mepraia)		<i>breyeri</i> , <i>eratyrusiformis</i> , <i>gajardo</i> ^c , <i>parapatrica</i> , <i>spinolai</i> ^{b,c}

a Especies fósiles.

b Especies que se han encontrado en ambientes domésticos o peridomésticos.

c Especies que se han encontrado infectadas con *T. cruzi*.

Anexo 2. Manifestaciones clínicas y diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.

	Distribución geográfica	Signos y síntomas clínicos	Diagnóstico
Formas agudas, incluida la reactivación en pacientes inmunosuprimidos			
Vectorial	Países endémicos	<p>Período de incubación de 1-2 semanas.</p> <p>Signos de puerta de entrada: lesión cutánea indurada (chagoma) o edema palpebral (signo de Romaña). La mayoría de los casos son enfermedades leves (95-99%) y no se reconocen.</p> <p>Fiebre persistente, fatiga, linfadenopatía, hepatomegalia, esplenomegalia, erupción morbiliforme, edema.</p> <p>En casos raros, miocarditis o meningoencefalitis.</p> <p>Anemia, linfocitosis, concentraciones elevadas de AST y ALT. Riesgo de mortalidad 0,2-0,5 %.</p>	<p>Métodos parasitológicos directos: parasitemia patente hasta 90 días. Examen microscópico de sangre fresca, películas sanguíneas delgadas y gruesas teñidas con Giemsa o leucocitos.</p> <p>Métodos de concentración: Microhematocrito y método Strout</p> <p>Técnicas de RCP</p> <p>Serología no es útil</p>
Congénita	Países endémicos y no-endémicos	<p>Período de incubación: desde el nacimiento hasta varias semanas. La mayoría son asintomáticos o tienen una enfermedad leve. Prematuridad, bajo peso al nacer, aborto, muerte neonatal. Fiebre, ictericia, edema, hepatomegalia, esplenomegalia, síndrome de dificultad respiratoria, miocarditis, meningoencefalitis. Anemia y trombocitopenia. Riesgo de mortalidad <2%.</p>	<p>Métodos parasitológicos directos. Métodos de concentración: microhematocrito, método Strout. La microscopía directa también es útil.</p> <p>RCP: técnica más sensible</p> <p>Serología: después de 9 meses o más tarde</p>
Oral	Restringido a	Periodo de incubación 3-22 días. Fiebre, vómitos,	Igual que la vectorial

	áreas de países endémicos y brotes locales	edema periorcular, disnea, fiebre, mialgia, postración, tos, esplenomegalia, hepatomegalia, dolor en el pecho, dolor abdominal, hemorragia digestiva. Riesgo de mortalidad 1-35%.	
Transfusión y Trasplantes	Países endémicos y no-endémicos	Periodo de incubación 8-160 días. Fiebre persistente Características clínicas similares a las de casos vectoriales (excluyendo el portal de signos de entrada). El riesgo de mortalidad es variable y depende de la gravedad de la enfermedad inicial.	Igual que vectorial Las técnicas de RCP generalmente arrojan resultados positivos de días a semanas antes de que los tripomastigotes se detecten en la sangre. Se necesitan muestras de tejido en algunas circunstancias.
Reactivación en pacientes infectados por VIH	Países endémicos y no-endémicas	Se comporta como otras infecciones oportunistas. Reactivación con <200 células CD4 por μ L (principalmente con <100). Afecta al SNC (75-90%) como lesiones individuales o múltiples que ocupan espacio o como meningoencefalitis necrohemorrágica grave. Complicación cardíaca (10-55%): miocarditis, derrame pericárdico o empeoramiento de una miocardiopatía previa. Riesgo de mortalidad 20%.	Métodos parasitológicos directos, como en casos vectoriales. El parásito se puede encontrar en CSF, otros fluidos corporales y muestras de tejido RCP: no es útil para el diagnóstico de reactivación Serología: indicativo de infección crónica y útil en casos de sospecha de enfermedad
Reactivación en otros pacientes inmunosuprimidos	Países endémicos y no-endémicos	Reactivación después del trasplante o en pacientes con neoplasias hematológicas. Características clínicas similares a las de los pacientes sometidos a transfusión y aquellos con paniculitis y otros trastornos de la piel. El riesgo de mortalidad es variable y depende de la	Métodos parasitológicos directos, como en casos vectoriales. El parásito se puede encontrar en muestras de tejido de RCP: el aumento de la carga del parásito detectado con RCP en tiempo real en

		gravedad de la enfermedad inicial y el diagnóstico precoz.	muestras en serie podría ser indicativo de un alto riesgo de reactivación
Forma crónica			
Forma indeterminada	Países endémicos y no-endémicos	Asintomático. Radiografía de tórax normal y ECG de 12 derivaciones	Serología: detección de IgG RCP: baja sensibilidad
Forma cardíaca y gastrointestinal	Países endémicos y no-endémicos	Manifestaciones cardíacas: fatiga, síncope, palpitaciones, mareos, accidente cerebrovascular. Manifestaciones tardías: dolor de pecho (atípico), disnea, edema, disfunción ventricular izquierda, insuficiencia cardíaca congestiva. Alteraciones en ECG de 12 derivaciones, ecocardiografía u otras pruebas de función cardíaca. Gastrointestinal: disfagia, regurgitación, estreñimiento severo (esófago dilatado o colon). Alteraciones en la manometría esofágica, el trago de bario o el enema de bario.	Serología: detección de IgG RCP: baja sensibilidad

Anexo 3. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas en dependencia de la fase clínica de la enfermedad

	Tratamiento
Infección aguda	
Vectorial y oral	Comience el tratamiento antiparasitario tan pronto como sea posible. Benznidazol 5-10 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 10-15 mg / kg por día durante 60-90 días. En niños menores de 12 años, benznidazol 10 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 15 mg / kg por día durante 60 días.
Congénita	Benznidazol 10 mg / kg por día durante 60 días, o nifurtimox 15-20 mg / kg por día durante 60 días.
Embarazo	En mujeres embarazadas, considere la relación riesgo-beneficio como con otros medicamentos potencialmente teratogénicos. La experiencia limitada con benznidazol no ha demostrado anormalidades neonatales.
Accidentes de laboratorio	Benznidazol 5-7 • 5 mg / kg por día o nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 10-14 días.
Post-trasfusional o trasplante de donador infectado.	Benznidazol 5-7 • 5 mg / kg por día o nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 10-14 días.
Vectorial y oral	Comience el tratamiento antiparasitario tan pronto como sea posible. Benznidazol 5-10 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 10-15 mg / kg por día durante 60-90 días. En niños menores de 12 años, benznidazol 10 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 15 mg / kg por día durante 60 días.
Infección crónica	
Niños	Benznidazol 5-7 • 5 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 60-90 días.

Adultos	Benznidazol 5-7 • 5 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 60-90 días. Especialmente indicado en mujeres en edad fértil. Contraindicado en mujeres embarazadas. Ningún beneficio esperado si la infección es de larga duración o es una enfermedad visceral moderada avanzada.
Individuos infectados con VIH.	Recomiende el tratamiento antiparasitario combinado con cART a todos los pacientes, como en los pacientes no infectados por el VIH, especialmente cuando el recuento de CD4 <200 células por μL .
Receptores de trasplante	La profilaxis antitrypanosomal a los receptores infectados con <i>Trypanosoma cruzi</i> antes del trasplante generalmente no se recomienda; considere el tratamiento previo al trasplante en posibles receptores de trasplante de corazón o en donantes vivos infectados con <i>T cruzi</i> . Se prefiere benznidazol 5 mg / kg por día a nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 60 días, con una estrecha vigilancia de la toxicidad del fármaco. Se necesita una monitorización parasitológica cuidadosa posterior al trasplante para excluir una posible infección derivada del donante (donante seropositivo y receptor seronegativo) o reactivación (receptor seropositivo).
Pacientes que reciben medicamentos inmunosupresores	Trate a todos los pacientes considerando el beneficio adicional de prevenir futuras reactivaciones. Se recomienda la monitorización parasitológica y debe ser particularmente estrecha en pacientes sin tratamiento tripanocida previo.
Reactivación	
Infectados con VIH	Comience el tratamiento antiparasitario tan pronto como sea posible. Benznidazol 5-7 • 5 mg / kg por día o nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 60 días. Considere dosis más altas para la afectación del SNC (benznidazol 15 mg / kg por día). Inicio temprano de cART (sin informes de <i>T cruzi</i> IRIS). Profilaxis secundaria con benznidazol 5 mg / kg por día tres veces por semana o 200

	mg diarios hasta recuento de CD4 > 200-250 células por μ L durante 6 meses y carga viral indetectable del VIH.
Receptores de trasplante	Benznidazol 5-7 · 5 mg / kg por día durante 60 días o nifurtimox 8-10 mg / kg por día durante 90 días, aunque se han recomendado cursos más largos. Monitoreo cercano por toxicidad.
Fracaso del tratamiento	
Inmunocompetente	El fracaso del tratamiento generalmente se considera cuando un resultado de la RCP es positivo. Considere el retratamiento si las indicaciones para el tratamiento original permanecen sin cambios o monitorea de cerca. El tratamiento antiparasitario podría incluir el mismo medicamento o uno diferente durante 60-90 días. Se pueden considerar terapias combinadas y cursos de medicamentos más largos.
Inmunosuprimidos	Inicie el retratamiento con el mismo medicamento o uno diferente durante 60-90 días. Podrían considerarse terapias combinadas y cursos de medicamentos más largos.

cART = terapia antirretroviral combinada. IRIS = síndrome inflamatorio de reconstitución inmune.

Anexo 4

CONSENTIMIENTO INFORMADO**Información para la persona**

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" y la Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM) están realizando una investigación titulada **"Desarrollo de capacidades para el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana y Africana en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"**. Para poder realizar esta investigación se necesita de su participación, pero antes de aceptar a participar usted debe entender sobre los objetivos de la misma. Para esto se le sugiere tomar su tiempo y leer detenidamente la información que se ofrece a continuación, para estar seguros de que usted tiene todos los elementos acerca del estudio (objetivos, exámenes de laboratorio, ventajas, desventajas, riesgos e inconvenientes). Usted puede discutir cualquier duda acerca de cualquier sección de este documento con los miembros a cargo del proyecto. Sugerimos tomarse su tiempo para tomar la decisión de participar en el mismo.

Si usted está de acuerdo en participar en el estudio, usted recibirá una copia de este documento y se le solicitará que firme la planilla de consentimiento informado.

Información acerca de la enfermedad

La Enfermedad de Chagas, es una enfermedad parasitaria y constituye un problema de salud en diferentes países de América Latina. La enfermedad es transmitida al humano fundamentalmente a través de las heces eliminadas por el vector infectado, del género Triatominae (Nombrado de diferentes formas en los países endémicos: chinche, chipo, chinchorro, chirimacha, vinchuca, pito, barbeiro), en el momento de alimentarse. La enfermedad humana tiene dos fases: una aguda, en la que los síntomas aparecen poco después de la infección, y otra crónica, en la que los síntomas aparecen tras un período silente que puede durar varios años. En un 40% de las personas infectadas, durante la fase crónica las lesiones afectan a órganos internos tales como el corazón, el esófago o el colon, y al sistema nervioso autónomo. Tras varios años de infección asintomática, del 20% al 30% de los casos infectados presentan manifestaciones cardíacas (que pueden producir muerte súbita), del 5% al 10% lesiones del aparato digestivo (fundamentalmente megavísceras), y los pacientes inmunodeprimidos presentan afectación del sistema nervioso central. En Cuba hasta el momento no se reportan casos autóctonos con Enfermedad de Chagas, sin embargo existe el riesgo de la transmisión vectorial al encontrarse en la isla especies de Triatomíneos. A este riesgo se une el constante flujo de personas procedentes de área endémicas de la enfermedad, la presencia en el país de estudiantes latinoamericanos que provienen de los 21 países endémicos de la enfermedad donde se ha demostrado la presencia de estudiantes con la enfermedad y la presencia de cubanos por largos períodos de tiempo en estos países endémicos. Todo esto hace la necesidad de contar con herramientas de diagnóstico para esta enfermedad.

Información sobre el estudio

La investigación tiene como objetivo introducir, diseñar y evaluar métodos de diagnóstico molecular para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, para de esta manera, desarrollar las capacidades del Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del IPK con vistas a contar con herramientas de diagnóstico más sensibles y específicas para dar un diagnóstico confirmatorio de certeza relacionado con esta Enfermedad, así como evaluar el algoritmo de confirmación diagnóstico que se sigue en nuestro país para esta enfermedad.

En este estudio estamos invitando a participar a todos los estudiantes de medicina procedentes de los 18 países endémicos de la Enfermedad de Chagas, que comenzarán sus estudios en la ELAM y que producto del pesquijaje de rutina que se le hace a su ingreso al país, establecido por el Programa de Control Sanitario Internacional del MINSAP, se le realizan estudios serológicos para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Así mismo estamos invitando a todos los colaboradores cubanos, procedentes igualmente de los países endémicos de la enfermedad, que como resultado del pesquijaje que se realiza en cada país previo a su regreso a Cuba, resulten positivos al método serológico de UMELISA® CHAGAS (Centro de Inmunoensayo, Cuba).

El estudio está previsto para realizarse en tres años a partir del 2014 y a los participantes se les indicarán la toma de muestra de sangre periférica total, una sola vez. Las muestras serán tomadas por personal calificado. En la ELAM se realizará en el laboratorio de Microbiología del Hospital de la ELAM y en el IPK en el laboratorio clínico del Hospital. La toma de la muestra se realizará bajo condiciones de asepsia, por el personal más indicado y autorizado por la ELAM y el IPK y bajo las condiciones de seguridad establecidas, para evitar la infección del personal de la salud con cualquier enfermedad transmisible que pueda presentar el paciente. Se realizará la extracción de 10 mL de sangre. De los cuales 5mL se utilizarán para obtener la muestra de suero y los restantes 5 mL de sangre se añadirán en tubos con un tampón específico. Las muestras de suero y sangre se conservarán en las condiciones óptimas. Una de las alícuotas de suero serán enviadas, según las condiciones establecidas por el Sistema Nacional

de Envío de Muestras, al Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de La Habana para estudios serológicos (UMELISA® CHAGAS) y la otra alícuota y la muestras de sangre serán enviadas al laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Parasitología del IPK para los estudios serológicos y moleculares. La muestra de sangre no será utilizada en otros propósitos que no sean para los cuales fueron tomadas. Adicionalmente a la toma de muestra, a cada persona que acepte participar en el estudio, se le realizará una entrevista. En dicha entrevista se recogerán datos demográficos, clínicos y epidemiológicos.

Los individuos involucrados en el estudio conformarán dos grupos, un grupo con enfermedad de Chagas y otro grupo control sin enfermedad de Chagas, pudiendo ser asignados a uno u otro en dependencia de los resultados serológicos. Estos grupos serán imprescindibles para la evaluación de la validez y seguridad diagnóstica de las técnicas a evaluar. Este último grupo lo constituirán todos los estudiantes que resulten negativos a las pruebas serológicas para la Enfermedad de Chagas. Los resultados serán informados por los médicos de asistencia de la ELAM y del IPK según donde sean atendidos los individuos involucrados. Los pacientes confirmados de tener la Enfermedad de Chagas mediante los métodos serológicos y moleculares serán tratados siguiendo los criterios establecidos por la OMS y las políticas del MINSAP, Cuba. Se utilizará benzonidazol 8mg/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.

Este estudio es financiado por el Ministerio de Salud Pública de Cuba.

Derechos de la persona

Usted tiene derecho a participar de manera voluntaria en esta investigación así como retirarse del mismo en el momento que así lo desee, sin dar explicaciones y sin afectar los resultados sobre la confirmación de tener o no la enfermedad resultado de la pesquisa que se realiza de forma rutinaria. No participar en el mismo, tampoco afectará la ulterior atención médica o tratamiento si se requiriera para esta enfermedad.

No existen restricciones ni limitaciones de los individuos involucrados en el estudio.

En términos de beneficios, usted tendrá un diagnóstico sobre la Enfermedad de Chagas, seguido de asistencia médica y tratamiento adecuado. Usted conocerá si tiene la enfermedad de Chagas y usted contribuirá a la mejora del diagnóstico de esta enfermedad en Cuba. Las técnicas moleculares con los que se obtengan los mejores resultados de sensibilidad y especificidad diagnóstica formarán parte del diagnóstico y la confirmación de los individuos con sospecha de la Enfermedad de Chagas.

Usted puede sentir una leve incomodidad durante la toma de la muestra de sangre periférica.

Durante el curso y una vez culminada la investigación los resultados serán informados a todo el personal involucrado en el proyecto (mediante actividades científicas anuales) donde podrán participar además todos los estudiantes y colaboradores que formaron parte de dicha investigación.

Su identidad y su participación en este estudio será estrictamente confidencial. Se asegurará la confidencialidad y seguridad de la información y los resultados. Para ellos cada individuo tendrá un código y de esta manera será manipulado en toda la investigación. El personal encargado del procesamiento de los datos no podrá en caso alguno, revelar directa, ni indirectamente los hechos, datos o informaciones que se hayan obtenido. Los sistemas de informatización tendrán incorporadas las medidas de seguridad necesarias que eviten la pérdida de los datos, la alteración de los mismos y que otras personas, no autorizadas, accedan a los datos de los individuos. Usted no será identificado por su nombre o de ninguna otra manera en ficheros, resultados o publicación concerniente a este estudio.

Contactos y personas a quien acudir en caso de preguntas o insatisfacciones:

Dr. Jorge Fraga
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
Departamento de Parasitología
e-mail: fraga@ipk.sld.cu
Tel: 7255-3660

Lic. Daisy Montoto Concepción
Escuela Latinoamericana de Medicina
e-mail: daisy@elacm.sld.cu
Tel: 7201-4345

Consentimiento para la firma

Él (la) que suscribe: _____

He sido informado(a) de que:

El Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" y la Escuela Latinoamericana de Medicina (ELAM) están realizando una investigación sobre la introducción, diseño y evaluación de métodos moleculares para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Esta enfermedad constituye un problema de salud en diferentes países de América Latina.

Declaro que he sido informado(a) del objetivo del estudio, así como la importancia de los resultados de la investigación para contar con métodos de diagnóstico altamente sensibles y específicos para esta enfermedad.

He sido informado que la muestra de sangre obtenida para el estudio no se empleará para realizar otras pruebas fuera de las concebidas dentro del proyecto actual de estudio.

Durante el curso y una vez culminada la investigación los resultados serán informados a todos los individuos que formaron parte de dicha investigación a través del médico de atención responsable en la ELAM o el IPK.

De este modo y por este medio hago constar mi disposición y consentimiento informado para participar en el estudio: "Desarrollo de capacidades para el diagnóstico molecular de la Tripanosomiasis Americana y Africana en el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"".

Para constancia de lo expuesto con anterioridad firmo este documento a los _____ días del mes de

_____ del año 201____.

Firma del individuo: _____

Testigo: _____