

Universidad de Granada
Departamento de Parasitología
Facultad de Ciencias



Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y en donantes de sangre): validación del antígeno Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODe) de *Trypanosoma cruzi*.

Fanny Guadalupe Concha Valdez

Tesis Doctoral en Medicina Clínica y Salud Pública
Granada, España, 2015

Editor: Universidad de Granada.Tesis Doctorales
Autora: Fanny Guadalupe Concha Valdez
ISBN: 978-84-9125-290-0
URI: <http://hdl.handle.net/10481/40978>

Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y en donantes de sangre): validación del antígeno Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODe) de *Trypanosoma cruzi*.

Memoria de Tesis doctoral presentada por D^a. Fanny Guadalupe Concha Valdez para aspirar al grado de doctor en Medicina Clínica y Salud Pública por la Universidad de Granada.

Fdo.

Fanny Guadalupe Concha Valdez

DIRECTORES DE LA MEMORIA

D. Manuel Sánchez Moreno
Catedrático de Parasitología
Universidad de Granada

Dña. Clotilde Marín Sánchez
Profesora Titular
Universidad de Granada

Esta tesis Doctoral ha contado con el apoyo de la Beca convencional PROMED/103-5/11/5484 otorgada la Secretaría de Educación Pública del gobierno de México

“Triunfador no es aquel que vence a los demás, sino el que se conquista asimismo, frenando sus defectos y superando sus límites”

Michael Phelps

“Si acrecentamos el saber y no aplicamos correctamente lo conocido, caminaremos a ciegas”

Teodoro Carrada Bravo

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Cuando pequeña me enseñaron que agradecer es un buen hábito, pero ahora sé que es más que eso.

*A Dios por permitirme llegar a este momento tan anhelado, que por motivos familiares fui dejando de lado, ¡ahora sé que nunca se equivoca!.

*A mis padres Guadalupe y Humberto, por siempre apoyarme y enseñarme a volar con alas propias desde muy pequeña, ¡los amo! Guadalupe (qepd) donde quiera que te encuentres solo quiero decirte que, ¡lo logramos! No se les olvide, todo se lo debo a ustedes.

*A Javier, mi amigo, cómplice, colega y esposo, por siempre apoyarme y dejarme ser, espero que pronto puedas lograrlo. Y estaré ahí para lo que necesites. ¡Te amo!

*A mis hijas, Alejandra (qepd) y María Fernanda, solo quiero decirles que mis ausencias me han dolido tanto como a ustedes, pero todo lo hago por y para ustedes. Recuerden son mi razón de vivir. ¡Las AMO!

*A mis hermanos Humberto, Alejandro, Ángel y Fernando por siempre estar para mí, como dice el dicho: “¡En la buenas y en las malas!”, y que las hemos pasado muy malas, pero estamos más unidos que nunca. ¡La familia es primero!

*A todos mis familiares por ser una parte importante de mi vida.

*A mis amigos siempre por estar presentes, y a toda esa gente buena de la bella Granada que ahora considero mis amigos Manuel Ochoa, las familias Sánchez Pérez-Lemaur, Ramírez Macías, Lozano Dumont, Toro Rodríguez, Angeles, gracias por todo, y saben que cuentan con mi amistad.

*A mis compañeros del laboratorio de Parasitología (los que están ahora y los que ya no). Gracias por su ayuda y por hacer más divertida la ciencia, y por acompañarme en estos últimos días a mi buen “Chava” .

Y un agradecimiento especial para mis directores de tesis, el Dr. Manuel Sánchez Moreno y la Dra. Clotilde Marín Sánchez, por todo su apoyo y brindarme la oportunidad de trabajar en el diagnóstico de esta enfermedad. Pero sobre todo gracias por su amistad.

No puedo olvidar agradecer a una persona muy importante en mi andar por el camino de la investigación, alguien que siempre me alentó para realizar el doctorado y que aquí estoy por fin logrando esta meta. Dr. Mario Barrera Pérez (q.e.p.d), ¡esta va también por usted, no de tanta lata en el cielo!

ÍNDICE

Índice

1. RESUMEN	12
2. INTRODUCCIÓN	18
2.1 Definición de Enfermedad de Chagas	18
2.2 Taxonomía	19
2.3 Epidemiología	20
2.4 Biología y Ciclo de vida	21
2.5 Mecanismos de transmisión	24
2.5.1 Transmisión Vectorial	24
2.5.2 Otras vías de Transmisión	28
2.5.3 Transmisión por Transfusión sanguínea	30
2.5.4 Transmisión vertical (Congénita)	37
2.6 Manifestaciones clínicas	41
2.6.1 Fase aguda	41
2.6.2 Fase crónica	42
2.7 Diagnóstico	42
2.7.1 Diagnóstico en la fase aguda	42
2.7.2 Diagnóstico en la fase crónica	43
2.8 Tratamiento	44
3. ANTECEDENTES	47

3.1	Importancia de la prevención de la transmisión sanguínea y la transmisión congénita de <i>T.cruzi</i>	47
3.2	Recomendaciones de la OMS	49
3.3	Importancia del uso de antígenos específicos	50
3.4	Importancia y limitaciones del diagnóstico	51
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	55
5.	HIPÓTESIS	58
6.	OBJETIVOS	60
7.	MATERIALES Y MÉTODOS	62
7.1	Poblaciones de estudio	62
7.2	Muestras	63
7.3	Cultivo de parásitos	64
7.4	Lisado de parásitos completos (fracción H)	64
7.5	Extracción y purificación de la Hierro Superóxido Dismutasa Excretada (Fe-SODe)	65
7.6	Pruebas serológicas para anticuerpos contra <i>T. cruzi</i>	66
7.6.1	ELISA Fe-SODe	66
7.6.2	Western blot	66
7.6.3	Inmunofluorescencia indirecta (IIF)	67
7.7.	Pruebas comerciales	68
7.7.1	Stick Chagas	68
7.7.2	Chagas ELISA IgG + IgM	69

7.7.3 Chagas Ab Rapid	69
7.7.4 ELISA Chagascreen	70
7.8 Análisis estadístico	70
8. RESULTADOS	75
9. DISCUSIÓN	90
10. CONCLUSIONES	101
11. BIBLIOGRAFÍA	103

1. RESUMEN

1. Resumen

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, es endémica en América Latina. La infección humana se transmite principalmente por insectos triatomíneos, pero hay otras formas de transmisión: la congénita (o vertical, transmitida de madres a hijos), la transmisión por transfusiones de sangre y trasplante de órganos, la transmisión oral y la que se da por accidentes de laboratorio.

Esta enfermedad ya no se encuentra exclusivamente en América Latina; se está produciendo en muchos países de Europa, y España es el país con la más alta prevalencia de Enfermedad de Chagas.

La transfusión de sangre es reconocida como la segunda forma más importante para la transmisión de la enfermedad de Chagas en países endémicos; y además, puede ser reconocida como más importante ruta de transmisión en países no endémicos. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de los individuos infectados por *T. cruzi* están en la fase asintomática crónica representan un riesgo significativo para la transmisión, debido a que podrían ser donantes de sangre infectada durante las transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos.

Actualmente, la transmisión congénita es la tercera vía de transmisión en importancia en los países endémicos, mientras que en los no endémicos ocupa el segundo lugar. El diagnóstico precoz de la transmisión congénita se considera fundamental, ya que puede pasar desapercibida porque las mujeres embarazadas infectadas por *T. cruzi* no están conscientes de la infección debido a la falta de información en las zonas endémicas, y, además, pueden estar en la fase crónica

asintomática lo que representa un alto riesgo de transmisión a los niños nacidos de estas mujeres.

El objetivo del presente estudio fue determinar la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en donantes del Centro Regional de Transfusión (CRTS) Sanguínea de Granada, España; del banco de sangre del Hospital General Regional (HGRZ) de Zona #17 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Cancún, Quintana Roo, México; y en mujeres embarazadas que acudieron a los servicios de obstetricia y ginecología del Hospital General de Mérida, Yucatán, México. Se buscaba determinar una prevalencia de la enfermedad de Chagas en estas poblaciones, y establecer la importancia del diagnóstico de estas dos importantes vías de transmisión.

Se realizaron ocho pruebas de diagnóstico serológico en cada una de **550** muestras de sangre recogidas en el CRTS de Granada. Se utilizaron dos pruebas de ELISA caseras, para poner a prueba un lisado de parásito (ELISA-H) y la proteína semipurificada Hierro Superóxido Dismutasa excreta por *T. cruzi* (ELISA-FeSODe); también utilizamos las técnicas de Western blot contra el mismo antígeno (WB-FeSODe), inmunofluorescencia indirecta (IIF) y cuatro pruebas serológicas comerciales.

Para los **969** donantes que acudieron al banco de sangre del HGRZ del IMSS, implementamos 5 pruebas de diagnóstico serológico; se utilizaron dos ELISAs caseras (ELISA-H y ELISA-FeSODe); Western blot contra el mismo antígeno (WB-FeSODe), inmunofluorescencia indirecta (IIF), y una prueba comercial.

En **155** muestras de suero de las madres y sus bebés fueron determinados anticuerpos anti-*T. cruzi* por ELISA, Western Blot, e IIF y una prueba comercial que

se utilizó para validar la eficacia de prueba ELISA-FeSODe. Los sueros de los bebés se recogieron a los 6 y 12 meses, mientras que las muestras de la madre solamente se obtuvieron después de dar a luz, junto con una muestra de calostro y otra de cordón umbilical.

Para las muestras del CRTS, los resultados de las pruebas serológicas mostraron un rango de valores de seroprevalencia: siendo el más bajo 1,1%, determinado por IIF y dos pruebas comerciales (Ab rapid y Chagascreen); otros valores fueron: 1,3% (ELISA comercial [Chagas ELISA IgG + IgM]); 2.1% (la prueba inmunocromatográfica [Chagas Stick]); 2,7% (ELISA-H); 4,0% (WB-FeSODe); y el valor más alto, 4.2% (ELISA-FeSODe). La fiabilidad de la técnica de ELISA-FeSODe mostró una sensibilidad de 100 (5/5) y una especificidad de 96% (528/545).

Los resultados de las pruebas serológicas que se les realizaron a las muestras de los donantes del banco de sangre del HRGZ de Cancún, mostraron una gama de seroprevalencias en orden ascendente: de 5 (0,51%) donantes por el ELISA comercial (Chagas ELISA IgG + IgM) y 19 (1,96%) por IIF, 43 (4,43%) detectados por ELISA-H; 115 (11,86%) por WB-FeSODe y 148 (15,27%) como la más alta seroprevalencia, la prueba de ELISA-FeSODe. La evaluación de la fiabilidad de la prueba ELISA FeSODe en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas mostró una sensibilidad del 99,13% y una especificidad del 96,01%.

Para las muestras de las madres y sus niños, del Hospital General de la ciudad Mérida, Yucatán se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en 8 (5.16%) madres por ELISA-WB-FeSODe, en 7 (4,51%) utilizando IIF y en 1 (0,64%) por kit comercial. Nueve (5,80%) niños de 6 meses fueron positivos en ELISA-WB-FeSODe, 7 (4,51%) por IIF, se obtuvieron resultados negativos cuando se usó la prueba

comercial. En los niños de 12 meses de edad, 15 (9,67%) fueron positivos por ELISA-WB-FeSOD, 13 (8,38%) por IIF y 1 (0,64%) por la prueba comercial. Además, se detectaron niveles de anticuerpos en 4 madres, sin embargo, sus hijos dieron resultados negativos. Cuatro muestras fueron positivas en las madres y sus hijos, pero sólo en uno de ellos se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en el cordón umbilical y hasta doce meses de edad, por lo que se asume que son anticuerpos propios del niño y así demostramos la presencia de transmisión vertical.

En este estudio nosotros identificamos una alta prevalencia de donantes seropositivos a *T. cruzi* lo que sugieren un alto riesgo de contaminación a través de la transfusión de sangre. Se sabe que las zonas endémicas se han superado por la migración desde las zonas rurales a las ciudades, originando que portadores de la enfermedad de Chagas sean donantes. Y demostramos que la enfermedad de Chagas no solo se presenta en personas de origen latinoamericano sino también de origen español. Por lo que se recomienda que el tamizaje de la infección por *T. cruzi* sea 100% obligatorio en todos los bancos de sangre, tanto en países endémicos como los no endémicos.

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas no se había informado en Mérida, Yucatán, pero se está produciendo en esta región. Sugerimos que es importante supervisar de cerca al niño nacido de madres infectadas al menos durante el primer año de vida, como una iniciativa de prevención para evitar la propagación de la infección por esta vía.

La excelente sensibilidad y especificidad del antígeno Fe-SODe para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* en donantes nos llevan a afirmar que las

pruebas serológicas realizadas con este biomarcador podría proporcionar una detección útil y un método de confirmación de casos de la enfermedad de Chagas. Esta sería una prueba útil para el tamizaje de bancos de sangre y de mujeres embarazadas, con la finalidad de evitar la transmisión por la vía de la transfusión y congénita, respectivamente.

1.INTRODUCCIÓN

2 Introducción

2.1 Definición

Enfermedad de Chagas

La tripanosomiasis americana o también conocida como la Enfermedad de Chagas (EC) es una parasitosis, cuyo agente causal es *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), protozooario flagelado de la familia Trypanosomatidae; esta enfermedad fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1909, quien encontró el parásito en la sangre de una niña febril, de dos años (*Kropf, 2009*), se estima que afecta a cerca de nueve millones de personas, en el mundo entero (*Schofield y col., 2006, Câmara y Navarro, 2013*), con una alta morbilidad y más de medio millón de nuevos casos anuales, en la mayor parte se ha visto afección en niños (*Urbina y col., 2004*). En América Latina, 25 millones de personas viven en áreas de riesgo, y solo en 2008, 10,000 muertes relacionadas a esta enfermedad fueron reportadas.

La EC, es transmitida a los mamíferos de manera vectorial por insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae*, conocidos como chinche o vinchuca, estos insectos solo existen en el continente americano (*Câmara y Navarro, 2013; WHO, 2015*). Por lo tanto, esta enfermedad es endémica de Latinoamérica y abarca desde los estados fronterizos del sur de Estados Unidos hasta la región del sur de Argentina y Chile (*Coura y Días, 2009*).

Esta enfermedad se ha convertido en un problema de salud pública incluso en regiones no endémicas debido al riesgo de infección vertical (congénita) y transmisión horizontal por vía transfusión sanguínea de individuos infectados; y esto

es favorecido por la constante migración de personas de Centro y sur América hacia países desarrollados (Noia y col., 2002).

La importancia de la parasitosis radica en su elevada prevalencia, incurabilidad, grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral, y muerte repentina de personas aparentemente sanas (Carrada, 2004).

2.2 Taxonomía

Una diferencia fundamental entre los medios de transmisión ha sido incorporada en la clasificación de estos tripanosomátidos. *T. brucei* pertenece al grupo salivaria porque ellos son transmitidos en la saliva de la mosca tsetse. *T. cruzi* pertenece al grupo estercoraria porque su transmisión es por las heces del vector (Barrett y col., 2003)

La clasificación para *T. cruzi* acordada por Levine y col. (1980), es la siguiente:

Reino: Protozoa (Goldfuss 1818)

Filo: Sarcomastigophora (Honigberg and Balaniuth 1963)

Subfilo: Mastigophora (Diesind 1866)

Clase: Zoomastigophora (Calkins 1909)

Orden: Kinetoplastida (Honigberg 1963)

Familia: Tripanosomatidae (Doflein 1901)

Género: *Trypanosoma* (Gruby 1943)

Especie: *Trypanosoma cruzi*

2.3 Epidemiología

La EC ha sido considerada como un problema importante de salud pública en muchos países de América Latina durante muchas décadas. Su impacto socioeconómico es alto. El Banco Mundial y la Organización Mundial de la Salud (OMS) han considerado la tripanosomiasis americana como la cuarta enfermedad más transmisible por tener un gran impacto en la salud pública en América Latina después de la malaria, la tuberculosis y la esquistosomiasis. La enfermedad de Chagas crónica cuesta un estimado de 667 000 dólares por persona ajustados por la discapacidad de los años de vida perdidos (*Moncayo y Silveira, 2009*). Esta enfermedad se encuentra distribuida en casi todo el continente, y sus manifestaciones clínicas y características epidemiológicas son variables entre una zona endémica y otra. Los datos reportados actualmente a nivel global, no reflejan la verdadera magnitud del problema, la mayoría son estudios aislados y aproximaciones estadísticas realizadas en zonas endémicas de países con mayor presencia del vector, pero estas cifras no son iguales para las zonas no endémicas (*WHO, 2006*).

La enfermedad de Chagas adopta varios patrones que dependen de la forma de transmisión y del estado de inmunocompetencia del individuo infectado. Así, la forma clásica de la de la enfermedad, la más frecuente en el mundo, es debida a la transmisión vectorial, y sus características principales son: 1) Se restringe solo al continente americano, incluyendo México, Centroamérica y Sudamérica. 2) Es un problema importante de Salud Pública en algunos países latinoamericanos. 3) Los vectores implicados en la transmisión de *T. cruzi* se incluyen en la familia

Reduviidae, subfamilia *Triatominae*. 4) La prevalencia de la enfermedad de Chagas está disminuyendo de forma considerable, gracias a actividades como la Iniciativa del Cono Sur. Pero de cualquier forma, la prevalencia sigue siendo elevada (Muro y col., 2010).

En áreas endémicas y en países en los que no existe la transmisión vectorial, la enfermedad de Chagas aparece en otros contextos (transmisión por transfusión, por trasplante de órganos, materno-fetal, alimentaria y por accidentes de laboratorio) (Grant y col., 1989; Villalba y col., 1992; Muro y col., 2010, Pereira y col., 2011, Toso y col., 2011)

2.4 Biología y ciclo de vida

Trypanosoma cruzi presenta cuatro fases en su ciclo de vida: **epimastigote** y **tripomastigote metacíclico** en el hospedador invertebrado (chinche, triatomo), **amastigote** y **tripomastigote** en el hospedador vertebrado (mamíferos, incluido el ser humano). Estas fases se diferencian morfológicamente por la disposición del flagelo y la localización del cinetoplasto (estructura típica de estos protozoos localizada en una mitocondria gigante y con ADN propio).

La fase de epimastigote se caracteriza por ser una fase de multiplicación en el intestino del vector. Presenta un flagelo que inicia desde su cinetoplasto, situado en el centro del cuerpo del parásito y próximo al núcleo.

El tripomastigote metacíclico es la fase de diferenciación del epimastigote y se localiza en la parte distal del intestino del vector. Es la forma infectiva y su tamaño es similar al epimastigote, entre 20-25 μm .

La fase de replicación intracelular se denomina, amastigote. Adopta una forma redondeada con un flagelo secuestrado dentro del parásito. Mide entre 2-5 μm de diámetro. El cinetoplasto se ve como un cuerpo oscuro cerca del núcleo. Se multiplica por fisión binaria formando racimos o nidos llenando la célula hospedadora hasta que se rompe.

El tripomastigote es una fase de diferenciación del amastigote. Infecta nuevas células o es ingerido por el vector transmisor desde la sangre circulante del hospedador vertebrado. Tiene forma de C o S, y mide 20 μm de largo por 1 μm de ancho. En la unión de los dos tercios posteriores con el anterior se localiza el núcleo elipsoidal y vesiculoso; y en el extremo posterior se observa el cinetoplasto (*Muro y col., 2010*).

El ciclo biológico se inicia cuando el insecto vector (triatomino, chinche) realiza la obtención de sangre de un hospedador vertebrado. En ese momento, ingiere tripomastigotes que se transforman en epimastigotes en el intestino del insecto vector. Se multiplican por fisión binaria longitudinal y a los 10 días se transforman en tripanosoma metacíclicos, localizados en la porción distal del intestino de la chinche. Cuando el vector ingiere sangre para alimentarse y libera tripanosomas metacíclicos infectivos en sus heces cerca del sitio de la herida de la picadura. Estos entran en el hospedador a través de la herida o de los tejidos mucosos, como la conjuntiva (**Figura 1. 1**). Las especies de vectores triatominos más comunes para la tripanosomiasis pertenecen a los géneros *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*. Dentro del hospedador vertebrado, los tripomastigotes metacíclicos invaden las células cercanas al sitio de la inoculación (macrófagos u otros tipos celulares), donde se diferencian en amastigotes intracelulares (**Figura 1. 2**). Los amastigotes

se multiplican por fisión binaria cada 10 horas, lisando la célula (**Figura 1. 3**) y se diferencian en tripomastigotes, y luego se liberan al torrente circulatorio (**Figura 1. 4**). Los tripomastigotes infectan a las células de una gran variedad de tejidos y se transforman en amastigotes intracelulares en nuevos sitios de infección. Las manifestaciones clínicas pueden resultar de este ciclo infeccioso. Los tripomastigotes del torrente sanguíneo no se replican (a diferencia de los tripanosomas africanos). La replicación se reanuda sólo cuando los parásitos entran en otra célula o son ingeridos por otro vector. La chinche se infecta al alimentarse de sangre humana o animal que contiene parásitos circulantes (**Figura 1. 5**). Los tripomastigotes ingeridos se transforman en epimastigotes en intestino medio del vector (**Figura 1. 6**). Los parásitos se multiplican y se diferencian en el intestino medio (**Figura 1. 7**) en tripomastigotes metacíclicos infecciosos en el intestino grueso (**Figura 1. 8**) (*CDC, 2015; Muro y col., 2010*).

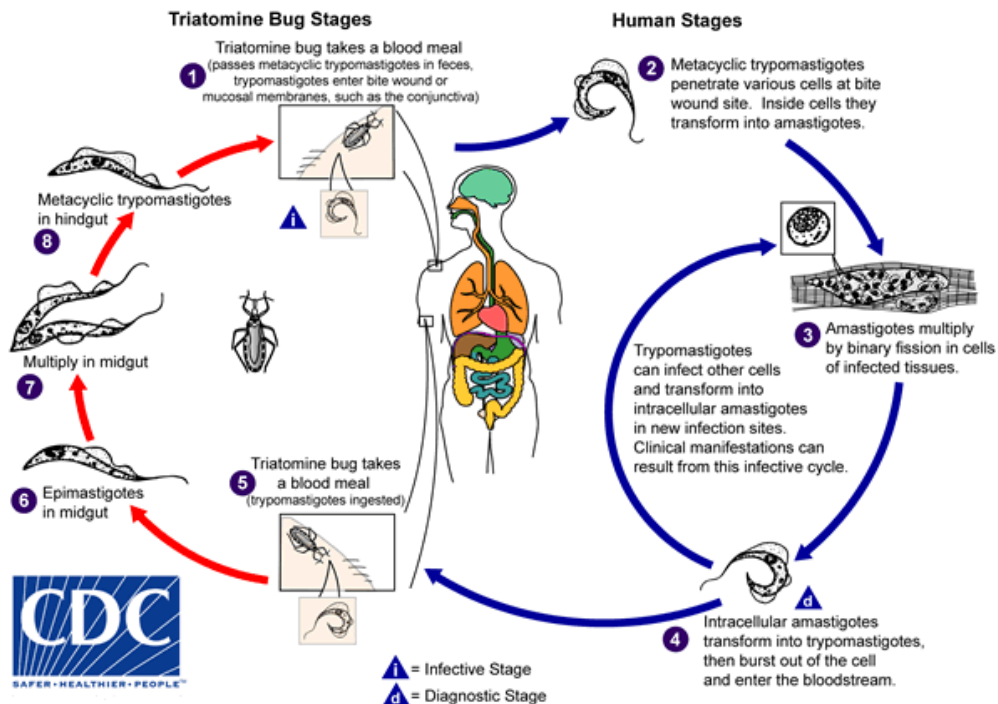


Figura 1. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* (Fuente: Centers for Disease Control and Prevention)

2.4 Mecanismos de transmisión

La EC es transmitida al humano y a más de 150 especies de animales domésticos (perros, gatos, cobayos, etc.) y mamíferos silvestres (roedores, marsupiales, armadillos, etc.) principalmente por grandes chinche hematófagas de la familia Triatominae, con tres ciclos superpuestos: doméstico, peridoméstico y selvático (*Rassi y col., 2010*).

Esta enfermedad también puede ser transmitida al hombre por otros mecanismos no-vectoriales, tales como la transfusión sanguínea y verticalmente de madres a niños (*Schmunis y Cruz, 2005; Yadon y Schmunis, 2009*), por la ingestión de alimentos y líquidos contaminados con *T. cruzi*, y por accidentes de laboratorio que están relacionados al manejo de parásitos vivos (*De Noya y col., 2015; Kinoshita y col., 2009*)

2.4.1 Transmisión Vectorial

La ECs transmitida de forma vectorial solo ocurre en el continente Americano y tiene dos diferentes patrones epidemiológicos. Por ejemplo en México, Centroamérica y el norte de Sudamérica los vectores se encuentran en el interior y en el exterior de la vivienda siendo más difícil su control. Mientras que en el Cono Sur, los vectores se encuentran de forma primordial en el interior de las viviendas (*Muro y col., 2010*).

El vector pertenece a una gran variedad de especies de triatominos que son una subfamilia de insectos, y la mayoría de la transmisión, es atribuida a tres

principales géneros: *Rhodnius*, *Panstrongylus*, y *Triatoma* (Patterson y Guhl, 2010). Aunque se han identificado más de 130 especies de triatominos, solamente un puñado son vectores competentes para *T. cruzi* (Galvão y col., 2003).

Historicamente, *T. infestans* ha sido con mucho el más importante vector, en las regiones endémicas sub-Amazonianas. *R. prolixus* está típicamente reportado en el norte de Sudamérica y América Central, y *T. dimidiata* (**Figura 2**) ocupa un área similar, pero además se extiende al norte en México (Rassi y col., 2010).

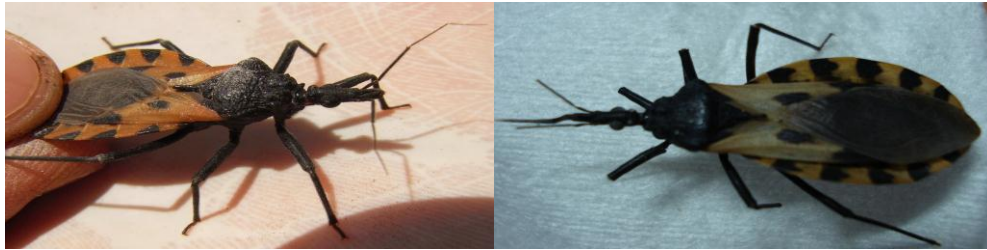


Figura 2. Ejemplares de *Triatoma dimidiata*, vector de la enfermedad de Chagas (Cortesía del Dr. Francisco Javier Escobedo, Laboratorio de Zoonosis y otras ETV's. Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi". Universidad Autónoma de Yucatán, México)

En México, se han identificado un total de 31 especies de triatominos consistentemente invadiendo casas y con importancia epidemiológica para la transmisión del parásito a humanos, y son: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma gerstaeckeri*, *Triatoma longipennis*, *Triatoma mazzotti*, *Triatoma mexicana*, *Triatoma pallidipennis*, *Triatoma phyllosoma*, y *Triatoma picturata*. Los vectores triatominos se han urbanizado en la mayoría de las regiones, lo que demuestra una alta tolerancia a los hábitats modificados por el hombre y los rangos históricos se han ampliado, exponiéndose más del 88% de la población

mexicana y dejando pocas áreas en México, sin la posibilidad de transmisión de *T. cruzi* (Martínez y col., 2008; Ramsey y col., 2015).

Trypanosoma cruzi emplea a más de 150 especies de animales salvajes y domésticos como reservorios. Algunos vertebrados silvestres (por ejemplo roedores, primates, carnívoros, murciélagos y marsupiales) y varios animales domésticos (cobayos, perros, gatos) son reservorios comunes para *T. cruzi* (Schofield y Galvao, 2010).

El ciclo selvático, probablemente, se estableció hace más de 9.000 años en la costa andina cuando varias especies de mamíferos comenzaron a actuar como anfitriones para *T. cruzi*. De hecho, segmentos de ADN del cinetoplasto del parásito han sido extraídos de las muestras de tejido de momias precolombinas en el centro de Brasil, el norte de Chile, y Perú (Aufderheide y col., 2004). El ciclo peridoméstico, se produce cuando los animales infectados viven cerca de las viviendas humanas. Viviendas rurales con defectos y grietas de la pared o techo crean un hábitat apropiado para triatomíneos y facilitan la transmisión doméstica (**Figura 3**). Estos insectos infestan agujeros de las viviendas en malas condiciones en muchas comunidades rurales de América Latina. Los insectos se encuentran en casas hechas de materiales como barro, adobe, paja y techo de palma. Durante el día, los insectos se ocultan en las grietas de las paredes y los techos y, durante la noche, cuando los residentes están durmiendo, salen de sus escondites. Y pican a las personas e ingieren la sangre, y defecan sobre el sitio de la picadura. La persona puede quedar infectada si los parásitos de *T. cruzi* presentes en las heces del insecto entran al cuerpo a través de las membranas mucosas o de heridas en la

piel. Sin darse cuenta, la persona dormida puede accidentalmente rascarse o restregarse las heces en la herida dejada por la picadura, en los ojos o en la boca. El ciclo doméstico se da por la estrecha relación entre los habitantes y los animales domésticos que constituyen una fuente de sangre abundante y de fácil acceso, esto da lugar a que se alcanzan grandes densidades de vectores en el interior de las viviendas (CDC, 2015).

Valdez et al. (2015a), realizan un estudio con representaciones sociales y practicas encaminadas al conocimiento del vector y de la enfermedad de Chagas en una población del estado de Campeche, México. Ellos determinan que la transmisión de *T. cruzi* por la vía vectorial depende de una interacción concomitante entre riesgo biológico y ambiental en todo el paisaje, y la vulnerabilidad humana. Se tiene conocimiento detallado del vector, su ocurrencia y asociación con mamíferos en zonas no domésticas, los habitantes refieren haber sido picados y para ellos es algo “normal”, pero se tiene poco conocimiento acerca de la enfermedad. La transmisión de *T. cruzi* a los seres humanos no sólo depende de las características espaciales y geográficas, de los seres humanos, del vector, y de las poblaciones de parásitos, sino también en sus dinámicas temporales en todas las zonas. La infestación de las casas y re-infestación después del control doméstico de triatomíneos se debe principalmente a la presencia de animales salvajes infectados, animales de granja, y animales domésticos en y alrededor de las casas, y las condiciones físicas y las prácticas de mantenimiento de casas y entorno inmediato (Ramsey y col., 2005; Bustamante y col., 2009; Valdez y col., 2015b).

Los porcentajes de infestación por *T. dimidiata* que han sido determinados en la península de Yucatán están por encima de 70%, y el rango de infección va de 21,9 a 45,9%, cifras muy alarmantes (*Hernández y col., 2010; Ramírez y col., 2010; Koyoc y col., 2015*).



Figura 3. Ejemplo de viviendas de la zona rural en el Estado de Yucatán (México) considerado un área endémica, propicias para albergar al vector *T. dimidiata*.

2.5.2 Otras vías de transmisión

El primer caso de **transmisión oral** de *T. cruzi* fue reportado por primera vez en 1965 en Teutonia, Rio Grande del Sur (Brasil), donde la población afectada mostró síntomas clínicos compatibles con una infección aguda con *T. cruzi*. Desde entonces múltiples brotes de EC agudo, debido al consumo de alimentos y bebidas contaminados se han reportado en diferentes estados de Brasil, donde la ruta oral emerge como el mecanismo más importante de transmisión, así como en otros

países de Latinoamérica tales como Argentina, Bolivia, Colombia, Ecuador y Venezuela (Toso y col., 2011).

País	Región	n casos	Mecanismo	Año
ARGENTINA		1	Carne de animales	
	Chaco	1	Sangre de	
BRASIL	Teutonia, Rio Grande do Sul	17	Vegetales	1965
	Catolé do Rocha	26	Jugo de caña	1986
	Santa Catarina	24	Jugo de caña	2005
	Acre	3	Jugo de açaí	1968
	Amapá	61	Jugo de açaí	1968-2005
	Amazonas	9	Jugo de açaí	1968-2005
	Pará	217	Jugo de açaí	1968-2005
	Norte-Noreste	94	Jugo de açaí/caña	2006
	Norte-Noreste	88	Jugo de açaí/caña	2007
COLOMBIA	Tibú, Norte de Santander	6	No determinado	
	Guamal, Magdalena	22	Vino de palma	1999
	Bucaramanga	9	No determinado	2008
	Bucaramanga	1	No determinado	2009
ECUADOR	Secumbios		Carne de animales	
VENEZUELA	Chinchiriviche	50	Jugo de guayaba	2007
	Chacao	128	Jugo de frutas	2007
	Vargas	88	Jugo de guayaba	2009
	Total casos	845		

Tabla 1. Casos de transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Sudamérica (Fuente: Rev Med Chile 2011; 139: 258-266)

La fuente de contaminación ha sido atribuida a insectos infectados con *T. cruzi* que son macerados junto con la fruta usada para la preparación de jugos y de la carne de animales infectados (*Moncayo y col., 2009; Pereira y col., 2009*). Todos estos brotes agudos de Enfermedad de Chagas asociados con el consumo de bebidas y alimentos presentaban un atributo en común, características clínicas más severas comparadas con las de los pacientes que han sido infectados con *T. cruzi* por otras vías de transmisión (*Coura y col., 2002; Pereira y col., 2009*) Así, después de una latencia de 5 días post-ingesta, se expresa con una manifestación aguda, como resultado de la cual los pacientes desarrollan una miocarditis grave. El cuadro es de alta mortalidad, presentando peor pronóstico mientras menor sea la edad del paciente (*Barbosa, 2006*). En la **tabla 1** se presenta los casos de transmisión oral por *T. cruzi* en Sudamérica, los alimentos involucrados y el tiempo en el que se llevó a cabo el brote alimentario.

2.5.3 Transmisión por Transfusión sanguínea

En 1975, durante la 28^a Asamblea Mundial de Salud de la Organización Mundial de Salud, se aprobó la resolución WHA28.72, que indica la utilización y el suministro de sangre humana y productos sanguíneos de una manera segura. A través de esta resolución, los países miembros son instados a promover el desarrollo de los servicios nacionales de sangre basados en la donación voluntaria no remunerada, promulgar una legislación eficaz de gobierno para la operación de los servicios de sangre, y hacer otras acciones necesarias para proteger y promover

la salud de los donadores y receptores de sangre, y la seguridad de los productos sanguíneos (*WHO, 1975*). La transfusión de sangre y de productos sanguíneos es una parte esencial del cuidado de la salud para pacientes deficientes en uno o más componentes sanguíneos (*Schmunis y Cruz, 2005*).

La transmisión de la EC por transfusión sanguínea es la segunda vía más importante después de la vía vectorial en países endémicos, mientras que en los países no endémicos la transfusión es la vía más importante de infección (*Schmunis, 1999*). Así, en 1991, los países de Sudamérica (Argentina, Brasil, Chile, Uruguay, Paraguay, Bolivia y Perú) inician un programa de cooperación internacional, la Iniciativa del Cono Sur, cuyo objetivo era el control del vector y la transmisión por transfusión sanguínea (*Cámara y Navarro, 2013; Moncayo y Silveira, 2009*). Otro objetivo logrado por esta Iniciativa, fue el hacer obligatorio el tamizaje serológico de los bancos de sangre, que incluía el 100% de los bancos de sangre públicos y el 80% de los privados en Argentina, y de todos los bancos de sangre en Brasil, Chile y Uruguay (*Moncayo y Silverira, 2009*).

Hay diferentes factores que intervienen en la seguridad en el suministro de sangre a nivel mundial. Primero, la existencia de políticas gubernamentales, decretos y regulaciones, así como las normas establecidas por las sociedades de profesionales que establecen el marco jurídico para los bancos de sangre y la medicina transfusional. Segundo, hay repetición en los donadores voluntarios y altruistas que proporcionan sangre y procedimientos para la selección o eliminación de unidades potencialmente contaminadas y para garantizar la seguridad de los productos biológicos que pueden ser usados para transfusión. Tercero, la habilidad

del personal de salud para prescribir sangre cuando es realmente necesario. Cuarto, la sensibilidad de las pruebas usadas para hacer el tamizaje. Y por último, pero no menos importante, está el público en general, que proporcionan la materia prima para todas las funciones anteriores. Cada uno de estos factores pueden tener dificultades que podrían contribuir a proporcionar sangre contaminada (*Schmunis y Cruz, 2005; Moraes, 1999*)

Existen numerosos estudios encaminados a establecer la prevalencia de la EC en los bancos de sangre en varios países del mundo. En Brasil, en el estado de Ceará se estudiaron 3,232 donadores de sangre y se encontró que el 1.9% presentaba serología positiva a la EC. En Río Grande do Sul, 8,228 muestras fueron probadas por diferentes métodos (ELISA, Hemaglutinación e Inmunofluorescencia indirecta) y encontraron una seroprevalencia que iba de 0.4 a 0.5% (*Cámara y Navarro, 2013*). Y en otros países de América Latina, se han establecido prevalencias en bancos de sangre, como Argentina (4.9–17.6%), Bolivia (51%), Chile (3.7–14.5%), Honduras (11.6%), Paraguay (11.3%), Uruguay (4.7–7.7%), Venezuela (1.3%), Colombia (2.5-7.5%), Costa Rica (1.68%), Ecuador (3.2%) y Perú (12.9%) (*Moncayo, 2003*).

En México, para 1998 se reporta una prevalencia nacional de 1.5% en 18 bancos de sangre que pertenecen a la Secretaría de Salud, determinándose que el 15% de los receptores de sangre (1,912 personas) se encontraban en alto riesgo de contraer la infección (*Guzmán y col., 1998^a*). En 2008-2009 se estudiaron 55 de los 71 bancos de sangre que pertenecen al Instituto Mexicano del Seguro Social y que realizaban el tamizaje de la EC, obteniéndose una prevalencia total de 0.406%

en los donantes que acudieron a esta institución. La seropositividad osciló entre 0.013% (Aguascalientes) y 3.118% (Poza Rica, Veracruz) y se concluye que es necesario implementar el tamizaje de manera obligatoria del 100% de los donantes de sangre tanto como para los donantes de órganos y tejidos (*Novelo y col., 2010*). A pesar que en los países de América Latina se hace el tamizaje de la EC (**Tabla 2**), no existe el 100% de cobertura en algunos de ellos, por lo tanto la información disponible y las estimaciones, sugieren que la infección vía transfusión sanguínea continua ocurriendo (*Schmunis y Cruz, 2005*).

En Estados Unidos, en Los Ángeles se demostró que la prevalencia en esta ciudad era una de cada 2,000 donaciones analizadas (*Leiby y col., 2002*). El CDC estima que hay más de 300,000 personas infectadas por *T. cruzi* en los Estados Unidos, la mayor parte inconsciente de la infección, equiparando esto como una carga alarmante de la EC. Sin embargo, esto parece ser mitigado en gran medida por el tamizaje del 100 % de los donantes (*Custer y col., 2012*).

Dado que los insectos triatominos no aparecen en Europa, la transmisión a través de la donación de sangre debe ser considerada como la principal fuente de posibles infecciones (*Strasen y col., 2014*). Alrededor del 20% de los pacientes infectados de esta manera permanecen sin síntomas, y por lo tanto, no diagnosticada en la fase aguda (*Schmunis, 1991*).

País	1993-1995	1997	1999	2001-2002
Argentina	0	0	0	0
Bolivia	832	772	1,442	68
Brasil	ND	ND	0	0
Chile	11	9	6	11
Colombia	875	8	1	2
Costa Rica	85	28	244	29
Ecuador	20	8	3	0
El Salvador	85	0	0	0
Guatemala	33	ND	0	11
Honduras	0	1	1	0
México	ND	ND	722	360
Nicaragua	10	14	0	2
Panamá	5	143	102	52
Paraguay	40	0	1	1
Perú	ND	33	0	0
Uruguay	0	0	0	0
Venezuela	0	0	0	0

Tabla 2. Número potencial estimado de enfermedad de Chagas transmitido por transfusión por país y por año, teniendo en cuenta la falta de cobertura en el tamizaje en América Latina en 1993. ND no se determinó en ese año. (Adaptado de: Clin Microbiol Rev. 2005; 18:12-29)

El riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas después de la transfusión de una unidad de sangre por un donante infectado es del 10-20%, y depende de varios factores que incluyen: la concentración del parásito en la sangre del donante, los componentes sanguíneos transfundidos y la cepa del parásito. El riesgo de transmisión parece ser más alto por transfusión de plaquetas que por otro de los componentes sanguíneos. Los parásitos son capaces de sobrevivir dentro de las transfusiones durante un largo período de tiempo. El agotamiento de leucocitos, la

radiación o la congelación disminuyen el riesgo de infección, pero no la neutralizan. Períodos de supervivencia de 18 días a 4 ° C y hasta 250 días a temperatura ambiente se han reportado (*Pereira y col., 2011*).

La prevalencia de Chagas en los países de Europa en donde se encuentra más casos, están representados en la **tabla 3** y en la **figura 4**. Donde puede verse que los países más afectados son España, Italia, Francia, Alemania, Países Bajos, Portugal, Reino Unido, Suecia, Suiza y Bélgica (*Strasen y col., 2014*).

País	Población	Casos	Incidencia/10,000 habitantes
Bélgica	11,041,266	464.02	7.24
Francia	63,460,768	2,065.98	5.48
Alemania	81,843,743	2,007.97	3.98
Italia	60,820,764	9,200.20	27.98
Países Bajos	16,730,348	1,885.73	21.98
Portugal	10,541,840	1,548.96	25.07
España	46,196,276	75,358.53	307.09
Suecia	9,482,855	1,302.64	24.89
Suiza	7,954,662	1,171.48	22.34
Reino Unido	69,989,550	1,507.22	4.15

Tabla 3. Países de Europa con más casos de la Enfermedad de Chagas (Adaptado de: Clin Res Cardiol (2014) 103:1–10)

En Italia y el Reino Unido, las personas nativas de países endémicos se excluyen de la donación de sangre. En los otros países europeos, no hay ningún procedimiento común para la detección de la enfermedad de Chagas en las transfusiones (*Kitchen y col., 2012*).

La enfermedad de Chagas sigue siendo considerado como una enfermedad exótica en la mayoría de países europeos. Hasta ahora, sólo España, Francia y el Reino Unido han puesto en marcha un programa de detección de donantes de sangre en situación de riesgo para la enfermedad de Chagas (*Gascón y col., 2010*).

La dispersión de la Enfermedad de Chagas es debida en gran parte al flujo migratorio de países de América Latina hacia Europa. Dado que la transmisión a través de transfusiones de sangre, está sucediendo en países europeos, se requiere un programa de búsqueda activa de casos en Europa (*Strasen y col., 2014*).

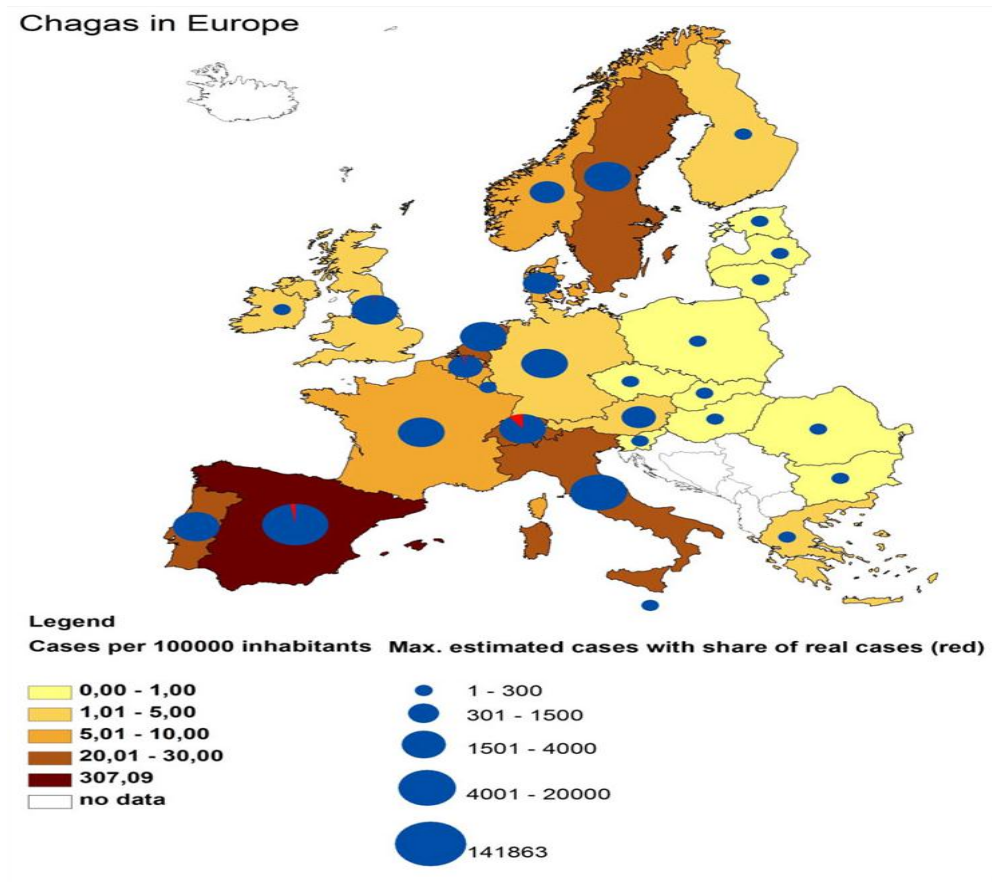


Figura 4. La incidencia de la enfermedad de Chagas de un color claro a un color oscuro, que muestra las mayores incidencias en España, seguida de Italia y Portugal, y, sorprendentemente, Suecia, Suiza y los Países Bajos. El número máximo absoluto de casos se muestra por manchas azules. España es el más afectado, seguido de Italia, los Países Bajos, Alemania y Francia. Las porciones de color rojo, son los pacientes identificados, siendo visibles sólo para Suiza, España y Bélgica (Fuente: Clin Res Cardiol (2014) 103:1–10)

2.5.4 Transmisión vertical (Congénita)

La transmisión congénita fue descrita por primera vez por Carlos Chagas en 1911, cuando realizó el primer registro de infección congénita por *T. cruzi* en dos recién nacidos que presentaron crisis convulsivas y que fallecieron a los 6 días de vida y en cuyas autopsias se determinó la presencia del parásito (Chagas, 1911).

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas supone un desafío para el control de esta enfermedad parasitaria, pues involucra no solo a los países endémicos, sino también a países no endémicos, en donde como consecuencia de la migración, viven mujeres en edad fértil portadoras de la infección por *T. cruzi* (Schmunis, 2007).

La transmisión vertical o congénita es causada por la transmisión de *T. cruzi* durante el embarazo, el parásito pasa a través de la sangre materna a la fetal y persiste después del nacimiento. La transmisión puede ocurrir antes del nacimiento (prenatal) o al momento del parto (perinatal). La transmisión congénita puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la crónica de la infección. Sin embargo, la mayoría de los casos de infección congénita se derivan de madres infectadas crónicamente después de haber sido infectadas por insectos vectores desde la infancia por residir en áreas endémicas de América Latina (Carlier y col., 2012).

Se estima que aproximadamente 2 millones de mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi*, y de estas surgen 14, 385 nuevos casos de transmisión congénita. Las tasa de transmisión varían en diferentes áreas geográficas, y van de 2.4% a 18.2% en regiones de Argentina, Bolivia y Paraguay. En Argentina la prevalencia de infección por *T. cruzi* en mujeres embarazadas que dan a luz en hospitales público es de 6-12% en la ciudad de Buenos Aires, un área no endémica, y la transmisión vertical ocurre en el 1-11% de los niños nacidos de madres infectadas (PAHO, 2006; de Rissio y col., 2010).

La incidencia de la transmisión congénita ha adquirido gran importancia debido a la urbanización de la enfermedad, que es causada por los constantes flujos

migratorios poblacionales desde las áreas endémicas hacia regiones o países donde no existe la transmisión vectorial (*Bisio y col, 2011*). La Organización Panamericana de la Salud (PAHO) enfatiza la necesidad de considerar a la infección congénita por *T. cruzi* como un problema de salud pública, y recomienda que cada país endémico pueda elaborar un protocolo dirigido a la detección puntual y al tratamiento específico de casos detectados de acuerdo a las capacidades de los servicios de salud local y a su situación epidemiológica (PAHO, 2014).

Los programas de control de la EC por transmisión vectorial y por transfusión sanguínea, están influyendo para que la infección congénita sea la vía de transmisión más importante en países endémicos, demostrando ser un problema de salud pública.

Existe información sobre la prevalencia de infección en mujeres embarazadas y el grado de transmisión congénita, durante períodos de tiempo y áreas geográficas estudiadas (Ver **tabla 4**).

País	Área	Año	Mujer emb. seropositiva		Caso congénito		
			n/N	%	n/N.....%		
Argentina	Buenos Aires	87-97	ND	ND	71/1118	6.3	
		90-91	62/729	8.5	2/38	5.3	
		95-04	ND	ND	4/159	2.5	
			00-06	ND	ND	47	ND
		Córdoba	87-97	ND	ND	37/721	5.1
		Salta	80-97	ND	ND	102	ND
			<93	149/937	15.9	6/149	4.0
			<99	34/276	12.3	3/34	8.8
			97-02	ND	ND	31/340	9.1
		Formosa	09		29.1	8/47	17.0
		Santa Fe	76-91	895/6123	14.6	9/341	2.6
		Tierra de Fuego	01-02	61	ND	3/68	4.4
		Tucumán	92-94	927/16842	5.5	26/364	7.1
		06-07	34/518	6.6	ND		
Bolivia	Cochabamba	92-94	444/1606	27.6	22/44	4.9	
		99-01	809/3879	20.8	47/809	5.8	
		Santa Cruz	79-80	161/317	51.0	25	
			88-89	ND	ND	78(13)	
			06-07	141/488	28.8	ND	ND
			<09	154/530	29.0	10/154	6.5
		Tarija	01	73/152	48.0	8/149	5.4
			02-04	172/508	33.9	8/153	5.2
			03-04	1144/2711	42.2	61/1176	5.1
	Brasil	Bahía	75-76	47/285	16.5	1/17	5.8
81-82			226/2651	8.5	3/186	1.6	
		Goias	75-04	145		2/278	0.7
		Sao Paulo	<99	57		3/58	5.17
		Nacional	<04	36/15873	0.2	1/36	2.77
Chile	Región III	82-83	31/869	3.6	0/3	0.0	
			Región IV	<84	68/453	15.0	2/61
			85-87	279/1974	15.6	2/51	3.9
			05-08	123/3324	3.7	2/80	2.5
		Santiago	57-68	ND	ND	30	
			<64	13/57	24.0	ND	ND
		79	11/402	2.7	2/11	18.2	
		81-82	27/1000	2.7	3/27	11.1	
Honduras	Nacional	82-90	ND	ND	24/336	7.1	
	Intibuca	06-07	22/500	4.4	ND	ND	
México	Chiapas, Veracruz	05-06	6/145	4.1	0.6	0.0	
	Guanajuato, Yucatán	06-07	8/988	0.8	ND	ND	
	Michoacán	98	ND	ND	1(16)		
Paraguay	Asunción, Sn Pedro	91-92	172/1862	9.2	9/123	7.3	
	Cordillera, Paraguari	95-04	7802/61091	12.7	104/1865	5.5	
Perú	Arequipa	01-02	22/3000	0.7	0/22	0.0	

Tabla 4. Reportes epidemiológicos en mujeres embarazadas y casos congénitos de infección con *T. cruzi* en países de América Latina. (Fuente: Carlier y Truyens, 2010)

2.6 Manifestaciones clínicas

2.6.1 Fase aguda

La EC tiene dos fases diferenciadas: La **aguda** y la **crónica**. Después de la infección, los parásitos se pueden observar en la sangre a partir del día 7 hasta el 14, y en este período, todos los tejidos pueden ser invadidos, pero los más afectados son: los macrófagos, el tejido muscular estriado, cardíaco, y el músculo liso. La **fase aguda** de la EC tiene lugar en 1 de cada 30 sujetos infectados, es usualmente asintomática o puede presentarse como una enfermedad febril autolimitada. Cuando los síntomas ocurren pueden incluir las siguientes manifestaciones clínicas que incluyen datos localizados y manifestaciones sistémicas. Predominan en niños y los tres signos localizados son: Inflamación en el sitio de inoculación (el chagoma), el signo de Romaña (edema palpebral unilateral, y se da particularmente en el caso de la transmisión vectorial) y la linfadenopatía regional (*Rassi y col., 2010; Muro y col., 2010; Carabarin y col., 2013*). Y las manifestaciones sistémicas son muy diversas e incluyen alteraciones digestivas como náuseas, vómitos o diarrea y síntomas como fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular y de las articulaciones, anorexia, linfadenopatía, hepatoesplenomegalia, edema y convulsiones. Las manifestaciones de la fase aguda pueden resolverse espontáneamente en cerca del 90% de los individuos infectados, incluso si la infección no es tratada con fármacos tripanocidas (*Rassi y col., 2010; Carabarin y col., 2013*); sin embargo, algunos casos agudos (<5-10%) sintomáticos ocasionalmente provocan la muerte como resultado de una miocarditis o meningoencefalitis severa, o ambas (*Rassi y col., 2010*).

2.6.2 Fase crónica

Durante la **fase crónica** pueden observarse dos formas de la enfermedad, una forma indeterminada (llamada también latente) y una forma sintomática. Un alto porcentaje de pacientes con la EC permanece en la forma indeterminada durante 10 o 30 años o durante toda su vida. Estos pacientes usualmente permanecen asintomáticos, sin signos clínicos o físicos de la enfermedad, pero con serología positiva. Algunas veces, el corazón y el tracto gastrointestinal no revelan hallazgos patológicos cuando exámenes radiológicos, electrocardiográficos o ecocardiográficos son usados, pero en otros pacientes, la forma cardíaca temprana de la fase crónica aparece con cambios en el electrocardiograma. Los pacientes asintomáticos solo pueden ser diagnosticados por el tamizaje de anticuerpos circulantes contra *T. cruzi*. Aproximadamente el 30-40% de los individuos infectados, varios años después de la exposición inicial, desarrollan los síntomas clínicos (*Carabarin y col., 2013*)

2.7 Diagnóstico

2.7.1 Diagnóstico en la fase aguda

El diagnóstico de la fase aguda, se basa en la detección microscópica de tripomastigotes en sangre periférica empleando métodos directos. Microhematocrito es el método de elección para determinar infección congénita porque tiene una mayor sensibilidad y solo una pequeña cantidad de sangre es necesaria. Examinación de sangre de cordón y sangre periférica del neonato por esta técnica

se recomienda en el primer año de vida. Otros métodos como la gota gruesa, el método de concentración de Strout, el de Bennet, biopsias, y el Xenodiagnóstico (solo se hace en centro de referencia, y consiste en colocar chinches libres de parásitos en el antebrazo del paciente durante 30 minutos, examinando unos días después al vector para observar si está infectado). Los parásitos con frecuencia pueden ser vistos en frotis teñidos con Giemsa. El principal inconveniente de estas técnicas es el hecho de que se llevan varias semanas para ser completados, y esto es mucho más tiempo en el cual se tienen que tomar decisiones para aplicar un tratamiento. Y finalmente la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (técnica más accesible en España y de resultados variables en la fase crónica) (*Muro y col., 2010; Rassi y col., 2010*)

2.7.2 Diagnóstico en la fase crónica

La EC crónica es usualmente diagnosticada por la detección de anticuerpos IgG que se unen específicamente a los antígenos del parásito. En la actualidad, cerca de 30 pruebas de diagnóstico serológico de la infección por *T. cruzi* están disponibles comercialmente. La mayoría de estas están basadas en los formatos del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), Inmunofluorescencia indirecta (IIF) y hemaglutinación indirecta, y estas son ampliamente usadas en Latinoamérica para pruebas clínicas y de tamizaje en donantes de sangre (*Leiby y col., 2000*). Muchas de estas pruebas están basadas en antígenos recombinantes. Algunas de estas pruebas tienen sensibilidades y especificidades que son menos que ideales, y reacciones falsas positivas ocurren con muestras de pacientes de enfermedades tales como leishmaniasis, sífilis, paludismo, y otras enfermedades

parasitarias y no parasitarias. Por estas deficiencias, la mayoría de las autoridades (OMS) recomiendan que las muestras sean ensayadas en dos o tres pruebas basadas en diferentes formatos antes que decisiones con respecto al estatus de infección sean realizados. Estas pruebas adicionales, sin embargo, acarrearán con una enorme carga económica y logística, particularmente en lo relacionado con las donaciones de sangre (*Rassi y col., 2010; Leiby y col., 2000*).

2.8 Tratamiento

Actualmente los dos fármacos indicados para el tratamiento de la EC son el Nifurtimos y el Benznidazol, el primero es un derivado nitrofurano y el segundo es un nitroimidazol, ambos son capaces de generar efectos adversos no deseados (anorexia, vómito, polineuropatía periférica y dermatopatía alérgica) y tienen una actividad significativa durante la fase aguda de la enfermedad, provocando la cura parasitológica hasta en un 80% de los pacientes tratados oportunamente. Sin embargo, durante la fase crónica de la enfermedad, estos fármacos tienen muy baja actividad tripanocida, de tal manera que más del 80% de los pacientes tratados son refractarios al tratamiento (*Carabarin y col., 2011*). El Nifurtimox se administra a una dosis oral diaria de 8-16mg/kg dividido en tres dosis durante 50 a 120 días. La dosis recomendada para el Benznidazol en infantes y en adultos es de 5 a 7 mg/kg por día, durante 60 días. Dosis mayores de 10mg/kg por día pueden ser administradas a neonatos e infantes de < de 1 año de edad. El tratamiento es administrado oralmente en una sola dosis, y su duración debe ser de 60 días y no puede ser menor de 30 días (*Cevallos y Hernández, 2014*).

3. ANTECEDENTES

3. ANTECEDENTES

3.1 Importancia de la prevención de la transmisión sanguínea y la transmisión congénita de *T.cruzi*

En personas que viven o proceden de áreas endémicas de la EC se deben adoptar medidas preventivas encaminadas a buscar la presencia de mujeres embarazadas infectadas con *T. cruzi* (casos congénitos), a la evaluación de la sangre transfundida y la búsqueda de posibles donantes de riesgo, la utilización de insecticidas en domicilios con el fin de eliminar a los triatomíneos y a la construcción de viviendas seguras con el objetivo de minimizar el contacto con el vector.

Los viajeros que vayan a zonas endémicas deben conocer el riesgo de transmisión de la región concreta que visitará, así como saber el nombre o reconocer a las chinches. También deben de evitar dormir en casas con grietas o agujeros y siempre utilizar mosquiteros. Por último, existe un desconocimiento de lo que es la EC, por lo cual se sugiere investigar acerca de las infecciones de las cuales podrían ser blanco, antes de viajar.

En España la EC es un problema emergente, y las cifras de inmigración procedente de Latinoamérica están próximas al millón y medio de personas, con más de 700, 000 mujeres en edad fértil. Desde el año 2005 existe una normativa estricta que obliga el tamizaje de donantes con un potencial riesgo de infección de *T. cruzi*. Si no se puede realizar la prueba, se excluyen como donantes. También existe un compromiso para evitar la transmisión vertical, y para eso existen diferentes iniciativas para el manejo adecuado de esta enfermedad. Se han organizado grupos de trabajo y se han elaborado documentos de consenso avalados por la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional

(SEMTSI) estableciendo criterios en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad, cuyo control es un reto no solo a nivel nacional sino internacional (*Muro y col., 2010*).

En Latinoamérica existe una vasta experiencia en la implementación de estrategias para la eliminación de enfermedades transmisibles y los progresos logrados en la reducción de la carga que significa la EC, para cuya prevención y control existen intervenciones de salud pública adecuadas y efectivas en función del costo; además de los logros obtenidos por los Estados Miembros por medio de las iniciativas subregionales de prevención y control de la EC, pero conscientes de la necesidad de ampliar las acciones existentes. La PAHO ha solicitado se multipliquen esfuerzos para alcanzar la meta ya establecida de eliminación de la transmisión vectorial de *T. cruzi* para el año 2015, así como para actuar sobre las vías de transmisión transfusional, transplacentaria, por donación de órganos y otras. Además que pongan en práctica las estrategias de prevención, diagnóstico, atención médica, tratamiento y control vectorial de una manera integrada, con amplia participación comunitaria, de manera que contribuyan al fortalecimiento de los sistemas nacionales de salud, incluidos la atención primaria de salud y los sistemas de vigilancia, de alerta y respuesta, teniendo en cuenta las particularidades de género y de los grupos étnicos. También solicita que apoyen las investigaciones tendientes a suministrar evidencia científica apropiada en las áreas de control, vigilancia, diagnóstico y tratamiento de la EC para alcanzar las metas establecidas en la presente Estrategia y Plan de acción, con énfasis en el desarrollo de pruebas diagnósticas asequibles y oportunas, incluida la prueba de cura, y medicamentos

más seguros; y estudien y, cuando proceda, promuevan una variedad de planes de incentivos para las actividades de investigación y desarrollo (PAHO, 2010).

3.2 Recomendaciones de la OMS

La Organización Mundial de la Salud aprobó la resolución WHA28.72 en 1975, durante la 28ª. Asamblea Mundial de Salud, en donde se instaba a los países miembros a promover el desarrollo en los servicios nacionales de transfusión de sangre (WHO, 1975). Cuando el país es responsable de la estructura y de las actividades del programa de transfusión debería: a) emplear profesional cualificado para dirigir los centros que componen el servicio total; b) contar con una apropiada infraestructura técnica, así como organizar e implementar el reclutamiento de los donantes; c) proporcionar un cuerpo de gestión profesional y responsable para la supervisión técnica del servicio; d) asegurar la colaboración entre los servicios de transfusión y su contraparte clínica; y e) una inversión de financiación segura y los gastos de funcionamiento de los servicios de transfusión, fomentando la formación y el desarrollo y promover la investigación en los campos relacionados a la transfusión. Se pide también el tamizaje obligatorio de los donantes de sangre para enfermedades infecciosas, siguiendo los procedimientos para asegurar la calidad, y el uso apropiado de la sangre (Schmunis y Cruz, 2005).

Las recomendaciones para el diagnóstico y prevención de la infección congénita de la EC serían: a) que los países endémicos consideren a la infección congénita por *T. cruzi* como un problema de salud pública; b) que cada país endémico pueda elaborar un algoritmo dirigido a la detección temprana y al tratamiento específico de acuerdo a las capacidades locales de los servicios de salud y a su situación epidemiológica; y c) los programas de control vectorial y tamizaje serológico de donantes de sangre tienen que ser implementados, porque son las vías más efectivas para prevenir las infección congénita (Carlier y Torrico; 2003)

3.3 Importancia del uso de antígenos específicos

Trypanosoma cruzi como en la mayoría de los patógenos, tiene un arreglo de antígenos de diferentes orígenes. En los sistemas de detección de anticuerpos, como con la serología, la selección de un antígeno apropiado es esencial para obtener resultados confiables. Y esto depende en qué es lo que los investigadores quieren saber. Si el punto es el diagnóstico de la enfermedad, un antígeno o un grupo de antígenos presentes en el parásito pueden ser suficientes. Los antígenos seleccionados podrían ser exclusivamente de *T. cruzi* y no estar presentes en otros patógenos.

Históricamente, los antígenos más fáciles de usar han sido los extractos del parásito completo, pero estos pueden dar reacción cruzada con otros patógenos. Esto ha llevado al uso de antígenos purificados de diferentes estructuras dando mejores resultados en términos de especificidad. Y un paso para tener una mayor especificidad fue el uso de antígenos recombinantes y/o péptidos sintéticos. Los antígenos excretados han sido muy usados ya que estos están relacionados con los mecanismos de diseminación del parásito y la resistencia a la respuesta inmunológica del hospedador. Además son moléculas detectables en fluidos corporales, como la sangre, incluso cuando la parasitemia es baja. De esta manera permitiría el diagnóstico tanto en la fase aguda como en la crónica, además de poder hacer un seguimiento del tratamiento de los pacientes chagásicos (Marín y Sánchez, 2010)

En este grupo de antígenos se encuentran las Superóxido Dismutasas (SOD), que son un grupo de metalo-enzimas antioxidantes con un importante papel en la defensa de los radicales superóxido que protegen a las células de la infección (Paramchuk y col., 1997). Estas enzimas se consideran factores de virulencia que protegen al parásito del ataque de la inmunidad del hospedador, su actividad ha sido detectada en las principales especies de tripanosomátidos (Ismail y col., 1997).

3.4 Importancia y limitaciones del diagnóstico

Para la correcta elección de una herramienta diagnóstica es importante tener en cuenta la fase de la enfermedad, es decir, si se sospecha de un caso agudo o crónico.

La fase aguda se caracteriza por una parasitemia patente, generalmente en los 2 primeros meses tras la infección, por lo que el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* se basa en la búsqueda del parásito. Transcurrido este período, la parasitemia disminuye por debajo de los límites de detección, por lo que el diagnóstico se realiza mediante la determinación de anticuerpos anti *T. cruzi* (González y col., 2008).

Si la persona se encuentra en la fase aguda, se recomiendan técnicas directas o de concentración. Las pruebas directas son las más sencillas y baratas, solo se necesita un frotis de sangre fresca. Si *T. cruzi* está presente, se verá como un cuerpo reingente con movimientos muy rápidos.

Dos de las técnicas de concentración más utilizadas son: la técnica de Strout y el microhematocrito.

Para la fase crónica existen diferentes pruebas diagnósticas tales como el Xenodiagnóstico, el hemocultivo, la inoculación animal, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las pruebas serológicas convencionales (Fijación del complemento, Hemaglutinación indirecta, Aglutinación directa, Inmunofluorescencia indirecta, prueba inmunoenzimática [ELISA]) y los métodos no convencionales (Radioinmunoprecipitación [RIPA], Western blot, citometría de flujo y Quimioluminiscencia).

La baja sensibilidad de las técnicas directas para el diagnóstico de la EC congénita es el principal reto para los programas de control y de investigación en el campo. Con el microhematocrito pueden llegar a perderse más del 50% de los niños infectados. La serología en la infancia tardía tiene una alta sensibilidad, pero las tasas de seguimiento son con frecuencia menores al 20%. Mientras la PCR tiene mucho más alta sensibilidad que el micrométodo para el diagnóstico temprano, la técnica presenta el inconveniente de que requiere un laboratorio bien equipado y

personal capacitado, y está más allá de los recursos de la mayoría de los programas de control.

En estudios de investigación, los infantes que no se diagnostican en los primeros meses de vida pueden ser mal clasificados como no infectado si las muestras no se examinan a los 6-9 meses por serología. La heterogeneidad de seguimiento puede, por tanto, contribuir a las diferencias en las tasas aparentes transmisiones entre los sitios de estudio.

La vigilancia en el tamizaje de la transmisión congénita y por transfusión sanguínea debe ser mantenida en regiones en las que se ha eliminado la transmisión vectorial de *T. cruzi* y en países no endémicos, para evitar la propagación de la EC por estas vías de transmisión.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4. Planteamiento del Problema

Gran parte del conocimiento que se ha obtenido durante el estudio de la enfermedad de Chagas ha resuelto importantemente el problema, porque ha prevenido o erradicado la enfermedad en algunos países de Sudamérica. Esta erradicación consistió en la interrupción de la transmisión vectorial intradomicilio; sin embargo, esto solo ha sido efectivo de manera temporal.

La transfusión de sangre es reconocida como la segunda forma más importante para la transmisión de la enfermedad de Chagas en países endémicos, y además, puede ser reconocida como la primera vía de transmisión en países no endémicos. Teniendo en cuenta que la gran mayoría de los individuos infectados por *T. cruzi* están en la fase asintomática crónica representan un riesgo significativo para la dispersión de la infección, debido a que podrían ser donantes de sangre infectada durante donaciones de sangre y trasplante de órganos.

El diagnóstico durante la fase crónica se hace muy difícil mediante detección por parasitemia, para lo cual se requieren técnicas más específicas como es el caso de la demostración de la presencia de anticuerpos IgG generados después de la infección *T. cruzi* mediante ELISA, que es una técnica inmunoenzimática, muy usada por su simplicidad, bajo costo y excelente desempeño con base en su sensibilidad y especificidad (Bosseno y col., 2002). Y a pesar de que se han obtenido resultados diferentes, e incluso debido al uso de diferentes fracciones antigénicas, se producen variaciones importantes en sensibilidad y especificidad, es de las pruebas más usadas (Vissoci y col., 1998). Estos problemas que se presentan en pruebas serológicas pueden solucionarse con el empleo de moléculas

excretadas en la fase de tripomastigote (*Matsumoto y col, 2002*). Por lo que sería conveniente realizarlo mediante el uso de la enzima Hierro-Superóxido Dismutasa excretada por *T. cruzi*, como antígeno, en pruebas serológicas caseras. Y proporcione resultados que permitan diagnosticar de manera más fiable y certera, en el tiempo oportuno en los casos de donantes en los bancos sangre.

La enfermedad de Chagas congénita es la tercera vía de transmisión de *T. cruzi* en países endémicos y la segunda en países no endémicos, en cuanto a la frecuencia que ocurre. A causa del éxito en los programas de prevención y control en la transmisión por el insecto vector y a través del tamizaje de las transfusiones sanguíneas, la importancia de este padecimiento va en aumento. Y, representa un problema de Salud Pública porque no existe ningún tipo de control ni la atención a los recién nacidos de madres infectadas con el parásito.

Existen estimaciones de que aproximadamente 2 millones de mujeres en edad fértil están infectadas con *T. cruzi*, y de estas surgen 14, 385 nuevos casos de transmisión congénita, y se sabe que las tasas de transmisión varían en diferentes áreas geográficas (OPS, 2006). En México no se cuenta con la información que permita establecer la magnitud de la tasa de transmisión congénita de *T. cruzi*; ni con técnicas de laboratorio de alta sensibilidad para ser utilizadas en el diagnóstico de esta vía de transmisión, para dar un tratamiento oportuno al niño antes del primer año de vida. En este estudio se quiere demostrar que el uso de la Fe-SOD como una molécula antigénica en técnicas serológicas, tendrá la suficiente sensibilidad y especificidad para realizar el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas por las vías de transmisión congénita y de la transfusión sanguínea.

5. HIPÓTESIS

5. Hipótesis

La utilización de la Hierro Superóxido dismutasa excretada (FeSODe) de *Trypanosoma cruzi* en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y en donadores de sangre de España y México) dará a las pruebas de ELISA y Western blot una buena sensibilidad y especificidad.

6. OBJETIVOS

6. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficacia de la FeSODe de *T. cruzi*, en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas (Chagas congénito y donantes de sangre).

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, usando la Fe-SODe como antígeno, en donantes de sangre en un banco de sangre del suroeste de España y en donantes del Hospital Regional General Zona, de Cancún, Quintana Roo; México..
2. Determinar la prevalencia de Chagas congénito en madres y sus niños, de la ciudad de Mérida, Yucatán, haciendo la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* utilizando pruebas que usen la Fe-SODe como antígeno.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7. Materiales y Métodos

7.1. Poblaciones de Estudio.

Población 1. Los Individuos asintomáticos incluidos en este estudio eran donantes voluntarios que asisten al Centro de Transfusión Sanguínea de la Provincia de Granada, España, (Centro Regional de Transfusión Sanguínea, CRTS), que recoge la sangre principalmente en las provincias de Granada, Jaén y Almería (sureste de España) . Las donaciones fueron examinadas para detectar infecciones transmitidas por la sangre (por ejemplo, VIH, malaria). Cada donante también responde a un cuestionario epidemiológico de la edad, sexo, lugar de nacimiento, fecha de llegada a España, las visitas a regiones endémicas de América Latina, y las condiciones de vida en la zona endémica (entorno rural, casa de adobe). También se incluyeron muestras de sangre de 12 controles positivos, estos sueros fueron diagnosticados por el CRTS de Málaga, España, y por el Centro Estatal de Transfusión Sanguínea del Estado de Cancún (CETS, México).

Para la *población 2*, se incluyeron los sueros de 969 donantes de sangre sanos, que acudieron al Hospital General Regional de Zona #17 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) de Cancún, Quintana Roo, México. Dentro de los criterios de selección se incluyeron a personas de ambos sexos, de entre 18-65 años de edad, que pesaron más de 50kg y que presentaron seronegatividad al virus de la hepatitis B (HBV), al de hepatitis C (HCV), a *Brucella abortus* (BrA), *Treponema pallidum*, *Plasmodium*, al antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B (HBsAg), y al virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV), y se excluyeron a

personas que hayan recibido trasplante, a mujeres embarazadas o lactando de acuerdo a la NOM-253-SSA2-2012.

La *población 3*, fueron mujeres embarazadas que acudieron de febrero a julio de 2012, a los servicios de obstetricia y ginecología en el Hospital General ubicado en Mérida, Yucatán, en el sureste de México. Los pares de madres-hijos fueron probados para la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* con pruebas serológicas comerciales y no comerciales.

7.2 Muestras

En la *población 1*, los sueros de los 550 donantes estudiados se recogieron entre marzo y junio de 2010 en el Centro de Transfusión Sanguínea de Granada (CRTS). Los donantes firmaron un formulario de consentimiento informado y el diseño del estudio fue aprobado por el Comité de Ética para la Investigación de la Universidad de Granada, España. La evaluación clínica y seguimiento se ofreció a todos los donantes positivos

En la *población 2*, las muestras fueron obtenidas del septiembre de 2011 a febrero de 2012 y colectadas de la vena cubital por medio del Sistema Vacutainer. Cada suero fue separado por centrifugación (1,200 x g por 10 min) y alicuotado en tubos de 1.5mL y congelados a -20°C hasta su uso. También fueron incluidos 10 sueros controles positivos, estos sueros fueron diagnosticados por el CRTS de Málaga, España, y del Centro Estatal de Transfusión Sanguínea de Cancún, México (CETS).

Para la *población 3*, se extrajo sangre de las madres y sus bebés de la vena cubital con previa desinfección del área y después se puso en tubos no tratados

(3mL) para las pruebas serológicas. Las sangres materna y de cordón umbilical, se recogieron justo después del nacimiento. Las muestras de calostro fueron colectadas por medio de "tira leches" estériles y puestos en tubos de 15 ml y congeladas a -20 °C, hasta su uso. Se tomaron muestra de sangre a los niños a los 6 meses y al año de edad, como se describe arriba.

7.3 Cultivo de Parásitos

Para obtener el antígeno, se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi* H4 (MHOM/MX/2001/H4) (Barrera y col., 2001) una cepa mexicana aislada de un paciente humano con patología severa, en el estado de Yucatán, México, la cual se creció de manera rutinaria en medio líquido axénico (MTL) (Gibco, Alcobendas, Madrid, Spain), suplementado con suero fetal bovino (inactivado) al 10%, a una temperatura de 28°C en frascos de cultivo de 25cm². El cultivo en fase exponencial de crecimiento fue concentrado por centrifugación a 600 x g durante 10 min.

Se cultivaron formas promastigotes de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/2001/UCM-10) de forma rutinaria en medio líquido axénico (MTL) y se procedió como se describe arriba. Esto fue hecho con la finalidad de estudiar si existía reacción cruzada con este microorganismo.

7.4 Lisado del parásito completo (fracción H)

Para obtener el lisado del parásito completo (o fracción H), el precipitado del cultivo mencionado arriba fue lavada dos veces con solución tamponada de fosfatos (PBS) y resuspendido en 3mL de tampón STE frío (0.25M de Sacarosa, 25mM de

Tris-HCl. 1mM EDTA, pH 7.8). Posteriormente, el precipitado fue desintegrado mediante tres ciclos de ultrasonido, cada uno de 60V durante 30 segundos. El sonificado fue centrifugado a 600 x g durante 10 min a 4°C, y el precipitado fue lavado 3 veces con tampón STE para un volumen total de sobrenadante de 9 mL. Esta fracción fue centrifugada (1,000 x g por 10 min a 4°C), y el sobrenadante (fracción H) fue colectada (López y col., 2012; Marín y col., 2009).

7.5 Extracción y purificación de la Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODe)

La extracción de Fe-SOD se obtuvo a través de cultivos de *T. cruzi* H4 y *L. infantum*, en fase exponencial de crecimiento. Los parásitos se lavaron dos veces en medio MTL sin suero, y se dispensaron en alícuotas de 5×10^9 parásitos/mL. Los parásitos se cultivaron posteriormente, una segunda vez en el mismo medio (MTL, sin suero) durante 24 h. El sobrenadante se obtuvo por centrifugación a 1500 x g durante 10 min y se pasó a través de un filtro de 0.45µm. El filtrado se precipitó dos veces, consecutivamente, con sulfato de amonio en concentraciones de 35% y 85%, respectivamente, y se centrifugó (9000 x g durante 20 min a 4 ° C) para obtener el precipitado, y finalmente se resuspendió en 2,5 ml de agua destilada y se dializó a través de una columna de Shepadex G-25 (Pharmacia, PD 10) (Longoni y col., 2012). El contenido de proteína se determinó utilizando el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar. La Fe-SOD obtenida se utilizó como antígeno en la ELISA y en el Western blot para el diagnóstico de *T. cruzi*.

7.6 Pruebas serológicas para anticuerpos contra T. cruzi

7.6.1 ELISA-FeSODe

La Fe-SODe se utilizó a una concentración de 1.5µg por pocillo para sensibilizar microplacas de polietileno (Nunc, Dinamarca) en tampón carbonato-bicarbonato (0,1 M, pH 9,6) durante 2 h a 37°C. La Fe-SODe que no se fijó en la placa fue eliminada lavando tres veces con solución tamponada de fosfatos con Tween 20 al 0.05% (PBS-Tween 20 al 0,05%, tampón de lavado). Se utilizó tampón de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0,2%, BSA al 1%) para cubrir los sitios libres de adsorción durante dos horas a temperatura ambiente y en agitación constante. Las muestras de suero, sangre del cordón umbilical y calostro se diluyeron a 1:200 y se incubaron a 37°C durante 45 min y el conjugado IgG-peroxidasa anti-humano (Sigma) se utilizó a 1:1000 y se incubó a 37°C durante 35 minutos. La reacción se reveló mediante la adición de O-fenilendiamina (Sigma) y 10µL de H₂O₂ al 30% por 25 ml durante 20 min en oscuridad. La reacción se detuvo mediante la adición de 50µL de HCl 3N. La absorbancia utilizada fue a 492nm en un lector de microplacas (Sunrise, TECAN). Todas las muestras se analizaron por triplicado. La media y la desviación estándar (DE) de las densidades ópticas de los sueros de controles negativos (20 humanos sanos) se utilizaron para calcular el valor de corte (media + 3 x SD) (Marín y col., 2014).

7.6.2 Western blot

La fracción de antígeno de Fe-SODe (a una concentración de 6 µg de proteína) se hizo correr en geles de IEF 3-9 y después se transfirió a una membrana (Hybond C Extra®, GE Healthcare®) de nitrocelulosa utilizando el kit de Phast-Transfer®,

como se describe por el fabricante (manual Phast-System ®). El método cualitativo Western-blot se llevó a cabo como se describe (López y col., 2012).

7.6.3 Inmunofluorescencia Indirecta (IIF)

Todos las muestras se sometieron a IIF, y los epimastigotes (misma cepa que la anterior) se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min, se lavaron tres veces con PBS y se suspendieron a una proporción de 5×10^6 parásitos/ml, y se depositaron 10µl en cada pocillo del portaobjetos para inmunofluorescencia hasta que la evaporación del tampón. Después, las células se fijaron con acetona pura (Sigma) a temperatura ambiente. A continuación, la tinción de inmunofluorescencia se realizó; los parásitos se incubaron primero con los sueros de los pacientes y sueros de control (positivos y negativos), durante 30 min a temperatura ambiente (a una dilución 1:32). El portaobjetos se lavó tres veces con PBS, y se incubaron 30 min a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario (IgG anti-humano conjugado con FITC; Sigma) a una dilución de 1/100 en PBS y con azul de Evans (0,003%). A continuación se lavaron 3 veces, nuevamente con PBS y se puso glicerina tamponada con PBS (9 volúmenes de glicerina, 1 volumen de PBS) y se colocó encima el cubreobjetos para el examen cuantitativo bajo un microscopio de fluorescencia MOTIC BA410 (Olivera y col., 2006; Marín y col, 2004).

7.7 Pruebas comerciales

7.7.1 Stick Chagas

Las muestras fueron examinadas simultáneamente para anticuerpos contra *T. cruzi* con una prueba comercial, **Stick Chagas**, siguiendo las instrucciones del fabricante (Operon, SA, Zaragoza, España) que es un prueba inmunocromatográfica capaz de detectar anticuerpos específicos contra diferentes antígenos de *T. cruzi* inmunológicamente relevantes. La prueba se basa en la captura inmunológica de micropartículas que son de color y cubiertas con una proteína multiantigénica durante su paso a través de una membrana en la que ha sido inmovilizada. Si la muestra (suero) contiene anticuerpos contra *T. cruzi*, éstos reaccionaron con las partículas coloidales rojas que están conjugadas a la proteína multiantigénica. Los complejos anticuerpo-partículas coloidales entonces migraron por cromatografía hacia la zona de reacción. En esta zona, se depositó, en una primera línea, la proteína multiantigénica representativa de *T. cruzi*, que capturó los complejos de partículas rojas-anticuerpos, produciéndose una banda transversal de color rojo.

En cualquier caso (muestra negativa o positiva), se verificó el desarrollo de una línea transversal de color azul, que indicó que la cromatografía se desarrolló correctamente en condiciones que aseguraron la reacción antígeno-anticuerpo.

Resultados de la prueba comercial:

NEGATIVO, apareció una sola banda transversal de color azul (control); POSITIVO, aparecieron dos bandas, una línea roja inferior (Positivo a Chagas) y una azul superior (control).

INVÁLIDO, No aparece ninguna banda, también deben considerarse inválidos todas las pruebas en las que no aparece la línea de control azul.

7.7.2 Chagas ELISA IgG + IgM

Chagas ELISA IgG + IgM (Vircell SL, Granada, España) es una prueba inmunoenzimática indirecta para determinación de anticuerpos IgG + IgM frente a *Trypanosoma cruzi* en suero o en plasma humano. El método se basa en la reacción de los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie del pocillo de poliestireno de la microplaca. Las inmunoglobulinas no unidas son eliminadas en el proceso de lavado. La globulina anti-humana reacciona con el complejo antígeno-anticuerpo y posteriormente reacciona con el sustrato tetrametilbencidina (TMB) para dar una reacción coloreada azul, que cambia a amarillo tras la adición de la solución de parado de reacción.

7.7.3 Chagas Ab Rapid

Chagas Ab Rapid (SD Bioline, Gyeonggi-do, Corea) es una prueba de detección inmunocromatográfica basada en la captura inmunológica de oro coloidal. Una membrana visible a través de una ventana tiene dos líneas precubiertas: la línea de prueba, marcada con T, y la línea de control, etiquetada con C. Cada línea incluye conjugados de oro: antígeno de *T. cruzi* recombinante conjugado con oro coloidal. La línea de la prueba tiene como principal componente al antígeno recombinante de *T. cruzi*, mientras que el componente principal de la línea de control es una inmunoglobulina de cabra anti-ratón. La presencia de anticuerpos

contra *T. cruzi* en la muestra se observa mediante un resultado cualitativo, cuando la muestra pasa a través de la membrana: la aparición de dos bandas rojas coloreadas (en las posiciones C y T) en la ventana de prueba.

7.7.4 ELISA Chagascreen

ELISA Chagascreen (BioRad, Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) es un ELISA cuantitativo llevado a cabo con microplacas recubiertas con antígenos citoplasmáticos y de membrana de *T. cruzi*. Los anticuerpos en la muestra del paciente son capturados por el antígeno presente en la microplaca, y se unen a la IgG anti-humana conjugada con peroxidasa; estos complejos se detectan mediante reacción de la peroxidasa con el sustrato cromogénico tetramethylbezidine (TMB).

7.8 Análisis estadístico

Los datos fueron registrados en una hoja de cálculo de Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA), y el análisis estadístico se realizó mediante el uso de SPSS Statistics (versión 17.0) software (IBM, NY, USA). Se realizaron estudios estadísticos basados en tablas de contingencia (prevalencia), utilizando el estadístico de chi-cuadrado (χ^2) para probar la relación entre las variables.

La sensibilidad y la especificidad de las pruebas serológicas fueron calculadas de acuerdo con *Thrusfield (2005)*.

Para calcular la sensibilidad y la especificidad de la técnica a evaluar, la ELISA (usando como antígeno la Fe-SOD excretada) realizamos una tabla de 2x2 donde se comparó ésta con la técnica con otra de referencia.

		Prueba Referencia	
		+	-
Prueba a evaluar	+	a	b
	-	c	d

Donde “a” representa el número de verdaderos positivos, “b” de los falsos positivos, “c” de los falsos negativos y “d” de los verdaderos negativos. Con estos datos podemos conseguir los índices para evaluar la calidad de la prueba diagnóstica que hemos realizado.

La **sensibilidad**, proporción de verdaderos positivos identificados por la prueba del total de sueros positivos. Se calcula con la fórmula siguiente, **S= a/a+c**.

La **especificidad**, proporción de verdaderos negativos identificados por la prueba del total de sueros negativos. Se calcula con la fórmula **E= d/b+d**.

La tabla también nos permitió determinar los valores predictivos de la técnica:

El **Valor Predictivo Positivo** es la proporción de sujetos verdaderamente positivos entre los que dieron positivo en la prueba. **VP+= a/a+ab**

El **Valor Predictivo Negativo** es la proporción de sujetos verdaderamente negativos entre el total de los que dieron negativo en la prueba. **VP= $d/c+d$**

Además, estos valores predictivos se relacionan directamente con la prevalencia de la enfermedad.

Prevalencia detectada por la prueba a evaluar. **P= $(a+b)/N \cdot 100$**

En este trabajo, la técnica usada como referencia (Inmunofluorescencia) no es una prueba de oro como tal, ya que no existe una prueba de oro para detectar *Trypanosoma cruzi*. Por lo tanto, para aumentar la fiabilidad de los resultados obtenidos, decidimos recurrir a determinar la concordancia, es decir, la conformidad entre ambas pruebas, lo que se expresa a través del parámetro Kappa.

Entonces, Kappa expresa la proporción de concordancia más allá del azar, por lo que un valor kappa 0 indica que no existe concordancia descontando el factor azar, mientras que un valor Kappa 1 indica una concordancia total. Así, Kappa no nos va a indicar cuál de los dos métodos da mejor resultado, sino que se limita a indicar si coinciden los resultados mostrados en ambas técnicas.

El cálculo de Kappa se obtiene a partir de la misma tabla 2x2 que anteriormente citamos.

La concordancia esperada debida al azar (EP) se calcula:

$$EP= (a+b)/N \cdot (a+c)/N + (c+d)/N \cdot (b+d)/N$$

La máxima proporción de concordancia no debida al azar es **1-EP**

La concordancia descontando el azar es **$((a+d)/N) - EP$**

El valor de Kappa es el cociente entre la proporción observada de concordancia descontando el azar y la máxima proporción de concordancia no debida al azar.

$$\mathbf{K = ((a+d/N)-EP)/1-EP}$$

8. RESULTADOS

8. Resultados

De los **550** donantes de sangre de CRTS de Granada que aceptaron participar en un estudio de prevalencia, fueron examinados para la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, mediante pruebas serológicas caseras y cuatro pruebas comerciales. De los 550 sueros, 53 (9,6%) 27 hombres y 26 mujeres fueron 'Latinos', es decir, pertenecían a individuos de países de América Latina donde la enfermedad de Chagas es endémica (Colombia, Ecuador, México, Perú, Argentina, Brasil y otros). Mientras que el resto (497/550 sueros, 90,4%. 241 hombres y 256 mujeres) eran 'Españoles', es decir, pertenecían a individuos nacidos en España (provincias de Granada, Jaén y Almería, sureste de España). Ver **Tabla 5**.

Con las pruebas serológicas caseras, el menor número de sueros positivos (seis) fueron detectados por IIF: cinco latinos y uno español. Un total de 15 sueros dieron una reacción positiva por ELISA-H (cinco hombres y 10 mujeres), seis latinos (dos hombres y cuatro mujeres), y de nueve españoles (tres hombres y seis mujeres). El mayor número de sueros que mostraron anticuerpos anti-*T. cruzi* fueron detectados por ELISA-FeSODe y WB (23 y 22 sueros, respectivamente). El suero positivo adicional detectado por la prueba basada en Fe-SODe era de un latinoamericano. Sin embargo, 14 sueros de españoles reaccionaron con ambas técnicas. Sorprendentemente, las pruebas ELISA y de WB mostraron que la mayoría de los sueros positivos pertenecían a las mujeres españolas, pero debe tenerse en cuenta que el tamaño de la muestra fue mayor (256 mujeres). La seroreactividad global varió de 1,1% (6/550) por IIF y dos pruebas comerciales (Ab rapid y Chagascreen) y de 1,3% (7/550) por el ELISA comercial (Chagas ELISA IgG +

Fecha de Nacimiento del donante	Origen y sexo del donante				Pruebas serológicas caseras												Pruebas serológicas comerciales							
					ELISA-H				ELISA-FeSODe				Western blot				Inmunofluorescencia indirecta				Chagas Ab rapid	ELISA Chaga-screen	ELISA Chagas IgG + IgM	Chagas Stick
	Latino		Español		Latino		Español		Latino		Español		Latino		Español									
♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀					
1992-88	1	1	34	65	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
1987-83	5	4	30	45	-	-	-	3	-	-	2	3	-	-	2	3	-	-	-	-	-	-	1	2
1982-78	6	9	28	31	-	3	-	2	-	3	1	2	-	2	2	2	-	2	-	-	2	2	2	4
1977-73	5	6	36	24	1	-	-	-	2	-	2	-	2	-	2	-	2	-	-	-	2	2	2	2
1972-68	3	3	27	26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1967-63	2	1	29	19	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
1962-58	4	1	27	15	1	-	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	1	1	1	1
1957-53	1	-	10	17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antes de 1953	-	1	20	14	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	1	1	1
total	27	26	241	256	2	4	3	6	4	5	8	6	4	4	8	6	3	2	1	0	6	6	7	12

Tabla 5. Reactividad de las muestra de suero de los donantes de sangre del Sureste de España, con las pruebas serológicas caseras y comerciales para *Trypanosoma cruzi*.

Reacción no detectada -, hombre ♂, mujer ♀, Lisado del parásito H, Hierro Superóxido Dismutasa excretada Fe-SODe

IgM), 2,1% (12/550) por la prueba de inmunocromatográfica (Stick Chagas), 2,7% (15/550) detectado por ELISA-H, 4,0% (22/550) por WB-FeSODe y 4,2% (23/550), la más alta seroprevalencia, detectado por ELISA-FeSODe.

Estadísticamente, no se detectaron diferencias entre el ELISA-FeSODe y el WB, y la comparación con IIF, Chagas SD, Ab rapid y ELISA Chagascreen mostraron diferencias menores. La prevalencia calculada estadísticamente se muestra en la **Tabla 6**. La prevalencia más alta correspondió a los sueros de origen latinoamericano, que van desde el 16,9% por ELISA-H al 9,4% por IIF. La prevalencia en sueros de origen español varió de 2,8% por ELISA-H y WB a 0,2% por IIF.

La **Figura 5** muestra el análisis de los sueros reactivos contra Fe-SODe por ELISA. Las personas nacidas entre los años 1978 y 1982 fueron las más propensas a ser positivas (seis sueros), seguido por el grupo de edad más joven, nacido alrededor de los años 1983-1987 (**Figura 5A**). Cuando comparamos la edad y el género, encontramos la misma tendencia en el intervalo 1978-1982, donde la más alta seroprevalencia correspondió a mujeres, mientras que el mayor número de sueros positivos pertenecientes a los varones se produjo en el intervalo 1973-1977 (**Figura 5B**). De acuerdo con los resultados de ELISA-FeSODe, el porcentaje de sueros positivos fue ligeramente mayor para los hombres (12 varones: cuatro latinos y ocho españoles; y 11 mujeres: cinco latinas y seis españolas) (**Figura 5C y 5D**).

Origen	ELISA-H		ELISA-FeSODe		Western blot		IIF		Chagas Ab Rapid		ELISA Chagascreen		ELISA Chagas IgG + IgM		Stick Chagas	
	Español	Latino	Español	Latino	Español	Latino	Español	Latino	Español	Latino	Español	Latino	Español	Latino	Español	Latino
Prevalencia (%)	2.8	16.9	1.8	11.3	2.8	15.5	0.2	9.4	0.2	9.4	0.2	9.4	0.2	9.4	1.0	13.2
	χ2 test		χ2 test		χ2 test		χ2 test		χ2 test		χ2 test		χ2 test		χ2 test	
	valor 17.2	valor-p <0.001	valor 25.7	valor-p <0.001	valor 27.7	valor-p <0.001	valor 41.4	valor-p <0.001	valor 41.4	valor-p <0.001	valor 41.4	valor-p <0.001	valor 33.6	valor-p <0.001	valor 36.3	valor-p <0.001

Tabla 6. Prevalencia de Trypanosoma cruzi en donantes del sureste de España, mediante pruebas serológicas caseras y comerciales.

H, es el lisado del parásito; **IIF**, Inmunofluorescencia indirecta; **Fe-SODe**, Hierro Superóxido Dismutasa excretada.

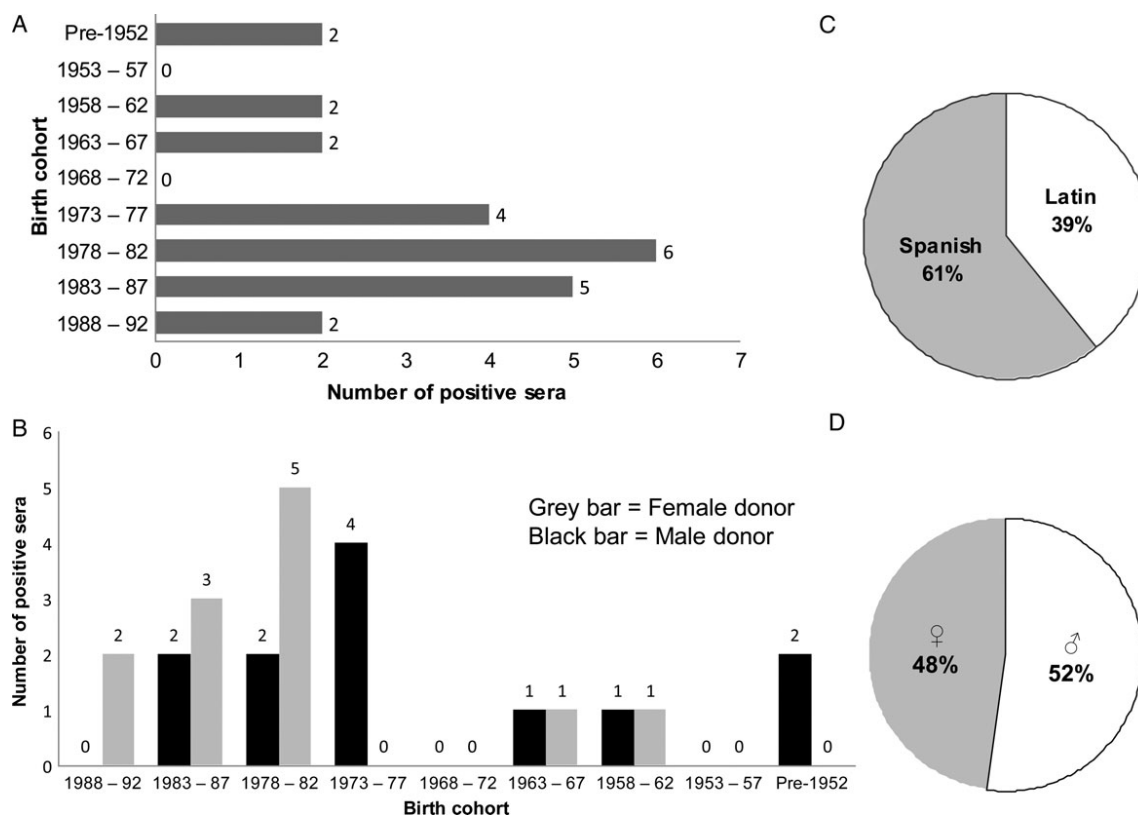


Figura 5. Análisis de sueros reactivos contra el antígeno Fe-SODe por ELISA, a una dilución de suero de 1/200. (A) la prevalencia de *T. cruzi* por intervalos de fecha de nacimiento; (B) la prevalencia por sexo; (C) la prevalencia según el origen de los donantes (América Latina o España); (D) la prevalencia por sexo del donante (♂ hombre; ♀ mujer). SODE: Superóxido Dismutasa excretada.

Dado el potencial de reactividad cruzada entre *T. cruzi* y *Leishmania* spp., Hemos evaluado esta posibilidad mediante el análisis de las muestras de suero contra la fracción Fe-SODe obtenida de *L. infantum* (FeSODE-Li), que es endémica en España (**Tabla 7**). El estudio de las muestras de suero por ELISA contra FeSODE-Li mostró que 22 sueros fueron positivos, es decir, una reactividad del 4% (22/550). La mayor proporción de sueros positivos a *L. infantum* fue de españoles

(de igual número de hombres y mujeres). Mientras tanto, entre las muestras de los latinos, dos hombres resultaron positivos. Sólo tres sueros fueron simultáneamente positiva para *T. cruzi* y *L. infantum*. Por lo tanto, la posible reactividad cruzada era menor a 1%, específicamente 0,5% (3/550). Ninguno de los sueros de control de Chagas fue también positivo para FeSODe-Li.

Fracción antigénica	Número de sueros positivos			
	Latinos		Españoles	
	♂	♀	♂	♀
FeSODe-Li	2	0	10	10
FeSODe-Tc	1	0	1	1

Tabla 7. Potencial reactividad cruzada entre *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum* en los sueros de donantes de sangre del Sureste de España.

♂, hombre; ♀, mujer; FeSODe-Li, Hierro Superóxido Dismutasa excretada de *L. infantum*; FeSODeTc, Hierro Superóxido Dismutasa excretada de *T. cruzi*.

Con respecto a la fiabilidad de las pruebas serológicas caseras para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en comparación con IIF (**Tabla 8**), la prueba WB tenía la mejor sensibilidad y especificidad (6/6=100% y 528/544=97%, respectivamente), con resultados similares a los de ELISA-FeSODe (sensibilidad y especificidad 5 /5=100% y 528/545=96%). Comparando el ELISA-FeSODe con WB como prueba de referencia, dio un índice Kappa de 0,93 (0,99-0,92 / 0,08), con una sensibilidad del 95% (21/22) y especificidad del 99% (526/528).

	IIF/ELISA-H	IIF/ ELISA- FeSODe ^a	IIF/WB ^b	WB/ ELISA- FeSODe ^c
Sensibilidad	83%	100%	100%	95%
Especificidad	98%	96%	97%	99%
PPV	38%	22%	27%	91%
NPV	99%	100%	100%	99%
Índice Kappa	0.67	0.37	0.42	0.93

Tabla 8. La fiabilidad de las pruebas serológicas caseras para la detección de *T. cruzi* en donantes de sangre del sureste de España en 2010

a cálculo realizado teniendo a IIF como prueba de referencia. **b** Cálculo tomando a WB como prueba de referencia. **c** Cálculo tomando a ELISA-FeSODe como prueba de referencia.

H: lisado de parásito; IFA: inmunofluorescencia indirecta; PPV: valor predictivo positivo; NPV: valor predictivo negativo; FeSODe: Superóxido Dismutasa excretada; WB: Western blot.

Los resultados de las pruebas serológicas con los donantes del banco de sangre de la ciudad de Cancún, Quintana Roo, México fueron los siguientes: Un total de 969 donadores de sangre fueron evaluados para la presencia de anticuerpos anti- *T. cruzi* usando cinco pruebas serológicas: ELISA-H, ELISA-FeSODe, WB-FeSODe, IIF y una ELISA comercial. Estos donadores tenían edades entre los 18 y 59 años, y una edad promedio de 34.1; 126 eran mujeres y 843 eran hombres, guardando una relación de 1:6.7. Todos los donadores fueron negativos para HBV, HCV, BrA, HBsAg, HIV, *Treponema pallidum* y *Plasmodium* y para todos los criterios que dicta la NOM-253-SSA2-2012.

La prevalencia encontrada usando las 5 pruebas serológicas, fue de menor a mayor como sigue: cinco donadores (0.51%) fueron positivos a la presencia de

anticuerpos anti-*T.cruzi* por la prueba comercial de Chagas ELISA IgG + IgM, 19 (1.96%) por IIF, 43 (4.43%) fueron detectados por ELISA-H, 115 (11.86%) por WB-FeSODe, y 148 (15.27%) por ELISA-FeSODe (**Figura 7**).

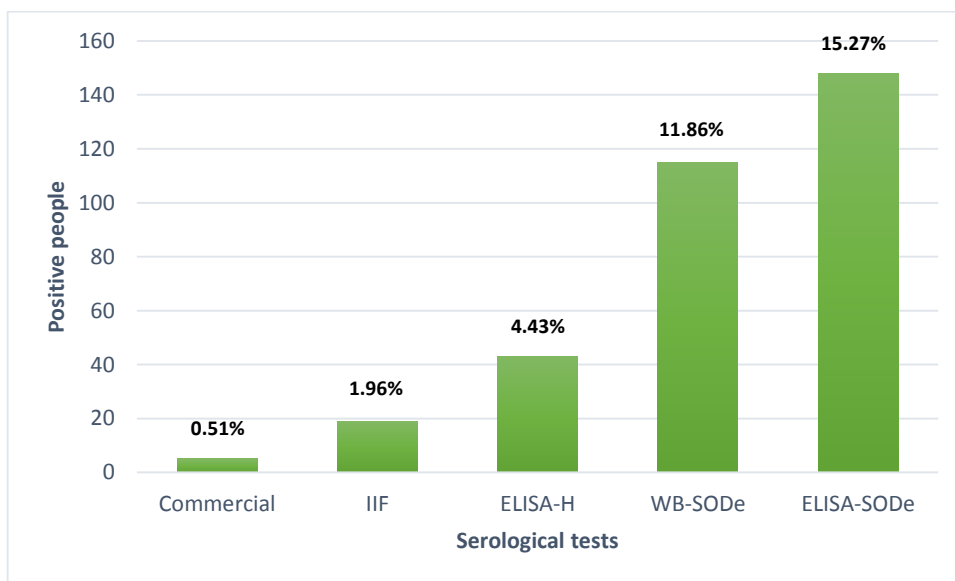


Figura 7. Prevalencia de donantes de sangre positivos a anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* con cinco diferentes pruebas serológicas.

Cabe mencionar que sólo a los 148 sueros que dieron positiva la ELISA-FeSODe y se les realizó la prueba de WB-FeSODe para confirmar la positividad de estas muestras, utilizando como antígeno Fe-SODe como se describe antes (**Figura 8**).

Existe la posibilidad de falsos positivos en la técnica de ELISA que pueda ser debida a reacciones cruzadas con otros protozoarios como otras especies de *Trypanosoma* y otras especies que pertenecen al género *Leishmania*. Sin embargo, en trabajos previos, nosotros hemos demostrado que Fe-SODe es especie-específica y por tal razón no presenta reacciones cruzadas con otros trypanosomátidos (Marín y col, 2009; Longoni y col., 2011). Se pudo demostrar también que las pruebas serológicas caseras pudieron detectar un número mucho mayor que la prueba comercial.

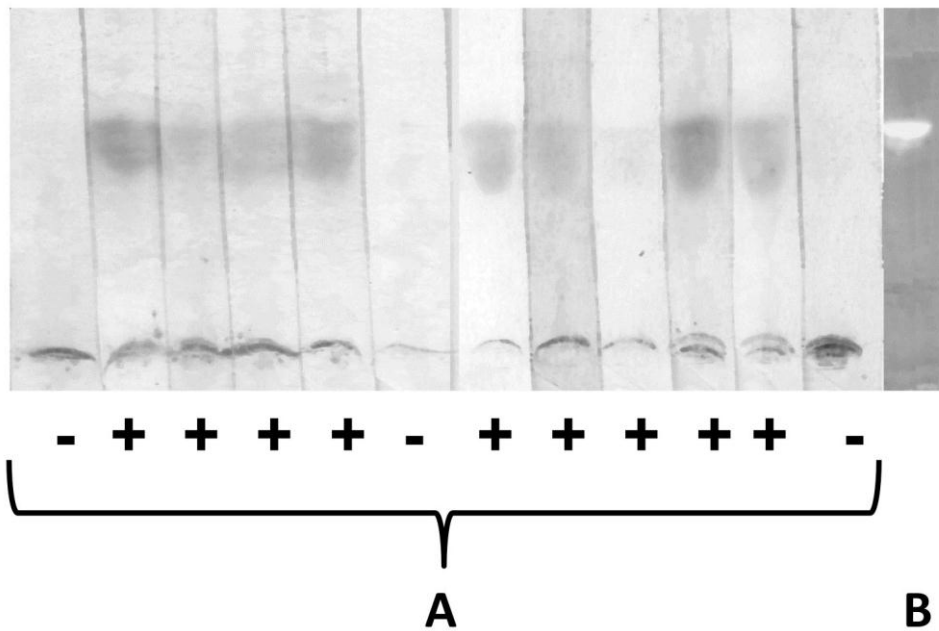


Figure 8. Western blot de algunos sueros positivos y negativos de donantes del banco de sangre de Cancún, Mexico, (A) contra el antígeno Fe-SODe de epimastigotes de *T. cruzi*, y, (B) actividad de la FeSODe teñida con la técnica de Beyer y Fridovich (1987).

Respecto a la fiabilidad de las pruebas serológicas caseras para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en comparación con IIF como prueba de referencia (Tabla 9) la prueba de ELISA-FeSODe tuvo la mejor sensibilidad y especificidad (100% y 86.42%, respectivamente), pero presentan una concordancia muy baja, de 0.200; y seguida de la prueba de WB-FeSODe (con una sensibilidad de 73.68% y una especificidad de 89.36%). Y cuando comparamos la ELISA-FeSODe con el WB-FeSODe como si fuera esta última una prueba de referencia, nos dio una sensibilidad de 99.13% y una especificidad del 96.01%, y el nivel de concordancia de 0.846, el cual se vio mejorado respecto a cuándo se compara con IIF ya que es sabido que esta prueba tiene una sensibilidad muy baja y en este estudio quedó demostrada.

	IIF/ELISA-H*	IIF/ELISA- FeSODe*	IIF/WB- FeSODe*	IIF/CT*	WB/ELISA- FeSODe ^a
Sensibilidad	52.63%	100%	73.68%	21.05%	99.13%
Especificidad	96.52%	86.42%	89.36%	99.89%	96.01%
PPV	23.25%	12.84%	12.17%	80.00%	77.00%
NPV	99.02%	100%	99.41%	98.44%	99.87%
Índice Kappa	0.3033	0.200	0.190	0.332	0.846

Tabla 9. Evaluación de la fiabilidad de las pruebas serológicas caseras.

*Cálculos hechos tomando a la IIF como prueba de referencia. ^aCálculos hechos tomando a WB como prueba de referencia. CT, Prueba comercial. PPV, Valor predictivo positivo. NPV, Valor predictivo negativo

En lo que respecta a los resultados de las muestras de la población de las madres y sus niños, se estudiaron un total de 155 pares (madre-hijo) que cumplieron con las cinco muestras previstas (suero de la madre, calostro, cordón umbilical, suero de los niños a los 6 y a los 12 meses). Todas las mujeres vivían en la zona urbana y peri-urbana de la ciudad de Mérida, Yucatán; México. La edad promedio de las madres fue de 23 ± 4.8 años, el número de embarazos fue de 2.2 ± 1.5 , el peso promedio de los niños al nacimiento fue de $3,096 \pm 0,420$ kilogramos.

Todas las muestras fueron probadas para las 4 pruebas serológicas (ELISA-FeSODe, Western blot, IIF y con la comercial, Stick Chagas). Se consideraron a las muestras como positivas, cuando daban 2 de las pruebas positivas. Y de esta forma todas las muestras que fueron positivas a ELISA-FeSODe resultaron ser positivas a WB.

Se detectó una seroprevalencia materna de 5,16% de infección por *T. cruzi* con ELISA-FeSODe/WB, 4.51% usando IIF y 0.64% con el kit comercial.

En los niños a los 6 meses de edad pudieron detectarse 9 (5.8%) positivos a ELISA-FeSODe/WB, 8 (5.16%) con IIF y ninguno dio positivo con el kit comercial utilizado. A los 12 meses; se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en 9.67% por medio de ELISA-FeSODe/WB, en 8.38% por IIF y en 0.64% con la prueba comercial (**Tabla 10**).

En cuatro de las 8 madres positivas, 3 lo fueron a las pruebas de ELISA-FeSODe/WB e IIF, mientras que una dio positiva a las 4 pruebas (las 3 anteriores y la prueba comercial), y nunca se detectó anticuerpos anti-*T. cruzi* en sus bebés, ni a los 6 ni a los 12 meses.

Caso	Madre				Niño a los 6 meses				Niño a los 12 meses			
	Prueba Diagnóstica				Prueba Diagnóstica				Prueba Diagnóstica			
	E	WB	IIF	PC	E	WB	IIF	PC	E	WB	IIF	PC
2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
6	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
7°	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
14*	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
15	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
20	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
21	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+
26	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
33	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
57	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
74	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
79	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
99	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
118	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Table 10. Relación de sueros positivos de madres después del parto y de los niños a los 6 y 12 meses de edad.

E ELISA; **WB** Western blot; **IIF** Inmunofluorescencia Indirecta ; **PC** Prueba Comercial

* caso que muestra la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en cordón umbilical

° caso que muestra la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* en colostro

Mientras, que en las otras cuatro madres positivas, se detectaron anticuerpos anti-*T. cruzi* en sus bebés. De éstas, dos casos, el 7 y el 14, llamaron nuestra atención porque el caso 7 además dio positiva la muestra de calostro y el caso 14 dio positiva la muestra de cordón umbilical, evidenciando un caso de transmisión

congénita, ya que su bebé dio positivo a las pruebas a los 6 y a los 12 meses, y como se sugiere que la presencia de anticuerpos después de los 8 meses de edad es indicativo de transmisión congénita (ya que los anticuerpos maternos han desaparecido [Carlier y col., 2011]), por lo tanto encontramos un rango de transmisión congénita de 12.5%.

A cinco niños (3.22%) se les detectó la presencia de anticuerpos desde los 6 meses y también al año de edad; sin que a las madres se les haya podido comprobar la infección. Lo que sugiere la edad tan temprana a la que el ser humano está expuesto a la infección por *T. cruzi*, en una zona considerada endémica.

A seis niños (3.87%) también se les detectó la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi* solo hasta el año de edad, haciendo un total de 11 niños (7.09%) con la presencia de anticuerpos anti-*T. cruzi*, sin comprobarse en las madres.

En lo que respecta a las pruebas serológicas utilizadas, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las técnicas de ELISA-FeSODe y WB por esta razón las comparamos como si fueran la misma al momento de hacer los cálculos estadísticos. Por tanto la sensibilidad de las técnicas de ELISA-FeSODe/WB fue del 100%, si consideramos a IIF como prueba estándar, mientras que la especificidad osciló entre 98 al 100%. Y haciendo esta comparación nos dio un índice de Kappa de 0.86 a 0.93 (ver **tabla 11**).

La prueba comercial no demostró ser una buena herramienta de diagnóstico, al menos en este estudio, ya que sólo 2 muestras fueron positivas, una correspondía a una madre y la otra a uno de los niños.

	IIF/ E-WB*	IIF/E-WB*	IIF/ E-WB*
	Madre	Niño a los 6 meses	Niño a los 12 meses
Sensibilidad	100%	100%	100%
Especificidad	99.32%	98.64%	98.59%
PPV	87.5%	77.77%	86.66%
NPV	100%	100%	100%
Índice Kappa	0.93	0.86	0.92

Table 11. Evaluación de la confiabilidad de las pruebas serológicas caseras.

* Cálculos hechos tomando a IIF como prueba de referencia. **IIF**: Inmunofluorescencia Indirecta; **E-WB**: ELISA SODe-Western blot; **PPV**: Valor Predictivo Positivo; **NPV**: Valor Predictivo Negativo.

9. DISCUSIÓN

9. Discusión

La transfusión de sangre es uno de los principales modos de adquisición de la Enfermedad de Chagas (EC) en los países no endémicos, y en países endémicos ocupa el segundo lugar de importancia en la transmisión de la infección. En algunos países endémicos, el 100% de las donaciones de sangre son examinadas para detectar la infección por *T. cruzi*. Esto ha reducido el riesgo de transmitir la infección por transfusión (*Schmunis y Cruz, 2005*) pero, debido a los casos de transmisión que ocurrieron antes de la llegada del tamizaje, es obligatorio en muchos países que los donantes de sangre llenen informes para evidenciar cualquier historial de EC (*Piron y col., 2008; Jackson y col., 2008; Gascón y col., 2010*). Aunque la legislación Europea requiere que los individuos con un historial de EC sean rechazados permanentemente como donantes de sangre, la mayoría de las personas con EC no presentan problemas de salud hasta muchos años después de haber sido infectados con *T. cruzi*. Debido al creciente número de personas de América Latina que residen en Europa y de europeos que residieron durante un tiempo en un área endémica, puede ser aconsejable para todos los bancos de sangre europeos poner en práctica un programa de cribado de EC en los donantes de riesgo. El análisis de sangre de donantes para EC no es universal en España, y se aplica sólo a los donantes seleccionados. Los criterios de selección incluyen el haber nacido en un país endémico para EC, ser el hijo o nieto de una madre nacida en una zona endémica, haber sido residente en zonas endémicas o de haber recibido una transfusión de sangre en un país endémico (*Ministerio de Salud, 2005*). El cribado de los donantes de sangre para determinar la infección por *T. cruzi* es

relativamente reciente en algunos países europeos (por ejemplo, desde alrededor del 2005 en España, Francia, Suiza e Inglaterra), y la inmigración comenzó mucho antes. Por tanto, es posible que un número de personas que recibieron transfusiones de sangre antes de 2005 podría haber sido infectado, aunque la mayor parte sería poco probable que presente síntomas hasta muchos años después de haber sido infectado.

España es conocida por ser el país con el mayor número de casos reportados de EC fuera de las áreas endémicas (*Pérez, 2012*). Sin embargo, hay relativamente pocos casos de EC transmitida por transfusión y no hay casos concretos que impliquen los productos sanguíneos transfundidos distintos de las plaquetas; hasta la fecha, cinco casos han sido reportados en cuatro regiones separadas (Madrid, Córdoba, Málaga, Galicia y el País Vasco) (*Benjamín y col., 2012*).

No hay estudios disponibles sobre el número de personas nacidas en un país no endémico y que nunca han viajado a un país endémico de EC y cómo podría haber sido infectado con *T. cruzi*, cuando el período en que la inmigración había comenzado y no se habían aplicado medidas de control para la EC. Es crucial para estimar la carga de la EC en países no endémicos, con el fin de poner en práctica las medidas de prevención y recursos para la detección y el tratamiento. Uno de los objetivos del presente estudio fue determinar la situación real con respecto a las donaciones de sangre, centrándose en el sureste de España (Andalucía oriental). De los **550** individuos muestreados en este estudio, un número significativo de los nacidos en España dio positivo a la infección por *T. cruzi* (prevalencia fue de 4,2% y 4,0% por ELISA y WB-SODe, respectivamente). Por desgracia, la principal

limitación de este estudio fue la falta de información; no existen entrevistas antes de la donación de sangre en los bancos españoles, no se solicita ninguna información a los donantes acerca de los viajes a zonas endémicas o de recibir una transfusión de sangre en esas zonas. La ausencia de estos datos nos impidió sacar conclusiones sobre el elevado número de personas nacidas en España infectadas con EC. Creemos que todos los donantes deben completar un cuestionario obligatorio donde se cubran estos puntos, a fin de identificar exactamente los que están en riesgo de EC, y que los donantes de alto riesgo sean cribados para la infección por *T. cruzi*.

Una dificultad que encontramos en el diagnóstico de laboratorio de la EC es la complejidad del proceso. Demostrar eficazmente que el parásito se encuentra principalmente en la fase aguda. Sin embargo, la mayoría de las personas son diagnosticadas en la fase crónica, cuando se vuelven asintomáticos, y en esta fase, el método principal de demostrar la infección es determinar la presencia de anticuerpos específicos IgG contra *T. cruzi* (Flores y col., 2010). No hay consenso sobre cuál es la técnica de laboratorio de elección, a pesar de los muchos estudios que han evaluado las diferentes pruebas para detectar anticuerpos específicos anti-*T. cruzi* (Langhi y col., 2002; Caballero y col., 2007). Investigadores latinoamericanos creen que, en la elección y preparación del antígeno, el genotipo de *T. cruzi* utilizado es crítico e influye en la variabilidad de la respuesta inmunológica (Miles y col., 2003; Triana y col., 2006). Otros investigadores sugieren que las pruebas del antígeno excretado/secretado de tripomastigote (TESA [trypomastigote excreted-secreted antigen]-blot) o el análisis de

radioinmunoprecipitación (RIPA) podría ser consideradas como como pruebas de referencia (*Umezawa y col., 1996*). Sin embargo, estas técnicas presentan también falsos negativos y los problemas de reactividad cruzada. Además, debido a las limitaciones técnicas de su comercialización, el uso de estas herramientas se limita a los centros donde han sido desarrollados (*Flores y col., 2010*).

En el presente estudio, se utilizó pruebas de ELISA/ WB utilizando la proteína excretada/secretada por *T. cruzi* (Fe-SODe) como antígeno, ya que se ha demostrado que tiene propiedades inmunogénicas que la hacen adecuada para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. Por otra parte, se ha confirmado que ninguna reacción cruzada se ha presentado con otras parasitosis tales como la malaria, toxoplasmosis o leishmaniasis (*Villagran y col., 2005; Mateo y col., 2010; López y col., 2012*).

En España, algunos bancos de sangre han implementado el cribado de EC para los donantes de riesgo, y los datos de seroprevalencia han sido registrados, aunque algunos de los resultados son preliminares. La seroprevalencia de la infección por *T. cruzi* varía de 0,05 a 1,38% en los estudios realizados (*Piron y col., 2008; Castro, 2006; Ontañón y col., 2007*). Sin embargo, de acuerdo con la prevalencia global reportada por Navarro y col. (2012), para España que es del 5,5%. La mayoría de estos datos se recabaron utilizando estuches comerciales, lo que podría explicar por qué los valores de seroprevalencia hallados en el presente estudio son mucho más altos que los reportados. El presente trabajo ha confirmado que el antígeno Fe-SODe da como resultado una prueba serológica mucho más sensible y específica.

Sin embargo, es necesario diseñar un ensayo más preciso basado en el antígeno Fe-SODe, particularmente para su uso en la práctica clínica, debido a las dificultades con el uso de WB / ELISA-FeSODe como herramienta de cribado y el costo relativamente alto de WB.

La técnica Stick Chagas fue la prueba comercial que mostró la mayor precisión en la detección de sueros latinoamericanos positivos. Sin embargo, no hay concordancia con los sueros reactivos de España.

La situación de la EC en españoles requiere la aplicación rápida y estricta de un programa de detección de sangre adecuado, ya que una vez que una persona está infectada con *T. cruzi*, la parasitemia persiste a un bajo nivel indefinidamente, convirtiéndolo en un donante de riesgo.

En lo que respecta a los resultados obtenidos de estudio con donantes de la ciudad de Cancún, Quintana Roo, podemos decir que México fue uno de los últimos países de América Latina en implementar un programa contra la transmisión de la enfermedad de Chagas, y a pesar de eso, ha avanzado a lo largo de estas últimas décadas, de tal forma que se ha aprobado una normativa de ley a nivel nacional, con la finalidad de evitar la infección por transfusión sanguínea (*NOM-253-SSA1-2012*). El índice de dispersión de enfermedades infecciosas por transfusión, disminuye de manera constante a través del tiempo en la mayoría de los países, en paralelo al incremento en la cobertura del tamizaje. Esto pudo ser demostrado ya que en 1999, se presumió que 722 personas fueron infectadas por transfusión sanguínea, mientras que en el 2002 se redujo a la mitad, a sólo pocos años de aprobarse esta Norma Oficial, aunque aún no se hace el tamizaje de donadores en

el 100% del territorio nacional, se considera obligatorio sólo para las zonas endémicas (*Schmunis, 1999; Schmunis y Cruz, 2005*).

Debido a que la EC mantiene la fase asintomática (crónica) por años o décadas, el individuo infectado puede convertirse en un potencial donador por mucho tiempo, y de acuerdo a la legislación de algunos países, hasta los 60-65 años (*Moraes, 1999; NOM-253-SSA1-2012*). El sujeto infectado genera una respuesta inmune y anticuerpos séricos específicos, por tal razón, las técnicas serológicas son el elemento principal en el diagnóstico de la EC crónica, ya que su utilidad es indispensable en el tamizaje de donadores para los bancos de sangre. Y se ha demostrado que pruebas serológicas comerciales que utilizan antígenos de otros países son menos sensibles o carecen de la precisión sugerida por el fabricante, que las que usan antígenos autóctonos (*Sánchez y col., 2001; Kirchhoff y col., 2006*) por esta razón nosotros utilizamos una cepa de *T. cruzi* aislada en la región (*Barrera y col., 2001*).

En un estudio realizado por Novelo y col., donde incluye a 55 de los 71 hospitales del IMSS que cuentan con banco de sangre, obtienen una prevalencia nacional de 0.406% utilizando HAI y ELISA-Chagascreen (que utilizan antígenos de cepas principalmente aisladas de Sudamérica), donde los bancos de Poza Rica, Cancún y Villahermosa son los que mayor seropositividad presentaron con 3.118%, 1.986% y 1,796%, respectivamente (*Novelo y col., 2010*). Si consideramos positivos a los doblemente reactivos (ELISA-FeSODe y WB-FeSODe) en este estudio tendríamos una seroprevalencia de 11.76% (114 donadores), donde el 20% de las unidades contaminadas transmiten la infección por trasfusión (*Schmunis y col.,*

1998). Además esta alta prevalencia demuestra que la enfermedad de Chagas ha dejado de ser una enfermedad confinada al área rural, debido a la alta migración que hay hacia algunas ciudades que son centros turísticos e industriales del país (Guzmán y col., 1998), vislumbrándose un escenario alarmante, ya que individuos infectados con *T. cruzi* podrían estar donando sangre sin que se les realice una prueba de tamizaje, ya que aún se encuentran zonas de México en donde la enfermedad no se considera endémica y en donde ya aparecen casos (Novelo y col., 2010).

En lo que respecta a las pruebas serológicas utilizadas, la que menor sensibilidad mostró fue la prueba comercial, posiblemente a que utiliza como antígenos una cepa sudamericana. Y como ha sido demostrado el uso de cepas autóctonas del parásito, en este caso una cepa aislada de la región (Barrera y col., 2001), aumenta la sensibilidad en la detección de pacientes chagásicos en México (Sánchez y col., 2001). Además de que las técnicas comúnmente aplicadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en México son la IIF y la IHA (Guzmán y col., 1998; Sánchez, 2002; Ramos y col., 2006; Novelo y col., 2010) y se sabe que la sensibilidad y la especificidad de estas técnicas es muy baja en comparación con técnicas como el ELISA (Sánchez y col., 2001). Se hace necesario el diseño de pruebas diagnósticas más precisas y basadas en antígenos autóctonos, de las que se utilizan actualmente en los bancos de sangre en México.

En el presente estudio, se identifica una alta prevalencia de donadores seropositivos a *T. cruzi* lo que sugiere un riesgo elevado de contaminación por transfusión sanguínea, así como que la transmisión de la enfermedad de Chagas

tenga lugar a pesar del tamizaje serológico en los bancos de sangre. Ya que se sabe que las áreas endémicas han sido rebasadas por la migración de las áreas rurales a las ciudades, llevando esto a portadores a ser donadores. Por tal razón se hace indispensable realizar el tamizaje serológico en el 100% de los donadores de sangre a nivel nacional, para evitar la propagación de esta enfermedad. Además de que el estado de Quintana Roo considerado como un estado de fuerte atracción migratoria del área rural, y como consecuencia, la transmisión de la enfermedad de Chagas mediante la transfusión sanguínea se está llevando a cabo (*Guzmán^a y col., 1998*).

Y finalmente, de las muestras de las madres y sus niños obtenidas en la ciudad de Mérida, Yucatán podemos decir: aunque la transmisión de *T. cruzi* de madre a hijo fue reportada por primera vez en México, en 1998, no existen suficientes reportes de la transmisión congénita de la Enfermedad de Chagas (*Guzmán^b y col., 1998*).

La seroprevalencia materna encontrada (5.16%) es muy parecida a la de dos estudios realizados en México (*Olivera y col., 2006; Jiménez y col., 2012*). Sin embargo es mayor (5.16% vs 0.80%) que la encontrada en dos ciudades de México, donde se incluye Mérida; esto pudo deberse a que nosotros utilizamos una proteína semi-purificada de una cepa autóctona como es la H4 (MHOM/MX/2001 /H4) (*Barrera y col., 2001*) para las pruebas de ELISA, WB e IIF mientras que en los otros estudios se usó un extracto crudo del parásito completo, y sugieren que la baja sensibilidad mostrada por la prueba comercial se debió a que no se usó una cepa autóctona del parásito (*Sosa y col., 2008*). Cuando estos mismos autores utilizan el

extracto completo de la cepa H1 (aislada en Yucatán) en una prueba no comercial en busca de aumentar la sensibilidad, obtienen que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre las pruebas comerciales y caseras utilizadas (Gamboa y col., 2011).

El porcentaje de transmisión congénita fue similar a un estudio hecho en México, en las ciudades de Guadalajara, Oaxaca y DF (Jímenez y col., 2012). La razón por la cual unas madres transmiten la infección a sus hijos y otros no, y en una gestación y en otra no, aún permanece desconocida (Oliveira y col., 2010). Esto fue lo que se pudo observar con la presencia de anticuerpos en 8 madres, y solamente en cuatro de sus niños. Por otro lado sólo pudo detectarse anticuerpos en una muestra de cordón umbilical, tanto a los 6 meses como al año, lo que sugiere la presencia de transmisión congénita, obteniéndose una tasa de 12.5%. Las madres y los niños que dieron positiva la presencia de *T. cruzi*, fueron enviados a la Secretaría de Salud del Estado para el tratamiento tripanocida.

El diagnóstico de laboratorio de la EC, es un proceso muy complejo, no existe un consenso sobre cuál es la técnica de laboratorio de elección, a pesar de que existen numerosos estudios en los que se ha evaluado diferentes técnicas de detección de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* (Caballero y col., 2007; Miles y col., 2003).

La sensibilidad y especificidad mostradas por las pruebas de ELISA y WB, demuestran que la proteína utilizada (Fe-SODe) como antígeno tiene propiedades inmunogénicas que la hacen apropiada para ser utilizada en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas (López y col., 2012; Villagrán y col., 2005).

La presencia de infección en los niños a tan temprana edad, hace pensar que entran en contacto con el vector posiblemente por múltiples factores tales como vivir en un área peri-urbana caracterizada por la pobreza y baja calidad de las viviendas, así como a las prácticas familiares de permitir que los animales domésticos como perros y gatos, convivan dentro de las casas, cuando se ha demostrado que estos animales representan reservorios para el parásito (*Apt y col., 2013; Gürtler y col., 2007*). Además los índices de infestación por *T. dimidiata* (más del 70%) y el rango de infección con *T. cruzi* encontrado en la Península que va de 21.8 a 45.9%, apoyan esta hipótesis (*Hernández y col., 2010; Ramírez y col., 2010; Koyoc y col., 2015*).

La mejora en la detección de la enfermedad de Chagas congénita implica aumentar el número de muestras durante las visitas prenatales y un monitoreo estricto de las madres infectadas al igual que sus bebés, y dar un seguimiento en algún momento durante el primer año de vida (*Salas y col., 2012*).

10. CONCLUSIONES

10. Conclusiones

1. Para el tamizaje de sangre en donantes de sangre y en mujeres gestantes en busca de la infección con *T. cruzi*, proponemos el uso de antígeno FeSODe debido a su excelente sensibilidad y especificidad confirmado para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi*.

2. Una prueba serológica con este biomarcador sería útil como herramienta de detección y como prueba de confirmación de la enfermedad de Chagas.

3. En este estudio, nosotros identificamos una alta prevalencia de donantes seropositivos a *T. cruzi* lo confirma que existe un alto riesgo de contaminación a través de la transfusión de sangre, por lo que se propone realizar un tamizaje en el 100% de la población donante a nivel mundial. Se ha demostrado que ahora la Enfermedad de Chagas no es exclusiva de países de Latinoamérica, sino que ahora está presente en la población de países no endémicos.

4. También se confirma el riesgo potencial de la transmisión congénita como una forma importante de dispersión de la enfermedad de Chagas. Sugerimos que es importante supervisar de cerca al niño nacido de madres infectadas al menos durante el primer año de vida, como una iniciativa de prevención para evitar la propagación de la infección.

11. BIBLIOGRAFÍA

11. Bibliografía

- Apt W, Zulantay I, Arnello M, et al. Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: a multidisciplinary study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107:98-104.

- Aufderheide AC, Salo W, Madden M, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:2034-2039.

- Barbosa PRB. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. *Int J Cardiol.* 2006; 112: 132-133.

- Barrera PM, Rodríguez FM, Guzmán ME, et al. Biological behaviour of three strains of *Trypanosoma cruzi* from Yucatan, Mexico. *Rev Biomed.* 2001;12: 224-230.

- Barrett MP, Burchmore RJS, Stich A, et al. The trypanosomiases. *Lancet* 2003; 362:1469-1481.

- Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion.* 2012; 52:1913–1921.

- Bisio M, Seidenstein ME, Burgos JM, et al. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011; 105:543-549.

- Boney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite.* 2014; 21:11.

- Bosseno MF, Barnabé C, Magallón GE, et al. Predominance of *Trypanosoma cruzi* I lineage in Mexico. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:627-632

- Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254.

- Bustamante DM, Monroy C, Pineda S, et al. Risk factors for intradomiciliary infestation by the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata* in Jutiapa, Guatemala. *Cad Saude Publica.* 2009; 25:S83-92.

- Caballero ZC, Sousa OE, Marques WP, et al. Evaluation of serological tests to identify *Trypanosoma cruzi* infection in humans and determine cross-reactivity with *Trypanosoma rangeli* and *Leishmania* spp. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:1045–1049.

- Câmara MPP, Navarro EC. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. *J Venom Anim Toxins*. 2013; 19:34.

Carabarin LA, González VMC, Baylon PL, et al. Enfermedad de Chagas: una enfermedad olvidada. *Elementos*. 2011; 84:5-11.

- Carabarin LA, González VMC, Rodríguez MO, et al. Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop*. 2013; 127:126-135.

Carlier Y, Torrico F. Congenital infection with *Trypanosoma cruzi* from mechanisms of transmission to strategies for diagnosis and control. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003; 36: 767-771.

Carlier Y, Truyens C. American Trypanosomiasis, Chagas disease. 2010. DOI:10.1016//978-0-12-384876-5.00022-8.

- Carlier Y, Torrico F, Sosa ES et al. Congenital Chagas Disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5: e1250.

- Carlier Y, Truyens C, Deloron P, et al. Congenital parasitic infections: A review. *Acta Trop*. 2012; 121:55-70.

- Carod AFJ. American tripanosomiasis. In: Handbook of Clinical Neurology, Vol. 114 (3rd series). Neuroparasitology and Tropical Neurology. H.H. Garcia, H.B. Tanowitz, and O.H. Del Brutto, Editors. 2013 Elsevier

- Carrada BT. *Trypanosoma cruzi*: Historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Rev Mex Patol Clin. 2004; 51:205-219.

- Castro E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. Enf Emerg. 2006; 8:48–50.

- Centers for Disease Control and Prevention. Last reviewed: March 17, 2015. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Consultado 14 de Julio 2015.

Cevallos AM, Hernández R. Chagas' disease: Pregnancy and congenital transmission. Biomed Res Intern. 2014. DOI:10.1155/2014/401864

- Chagas C. Nova entidade morbida do homen. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1911; 3:219-275.

- Coura JR, Junqueira Ac, Fernandes O, et al. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. 2002; 18:171-176.

- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease-100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104 (Suppl 1):31-40.

- Custer B, Agapova M, Bruhn R, et al. Epidemiologic and laboratory findings from 3 years of testing United States blood donors for *Trypanosoma cruzi*. *Transfusion*. 2012; 52: 1901-1911.

- De Noya BA, Díaz BZ, Colmenares C, et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110:377-86.

- De Rissio AM, Riarte AR, García MM, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina. *Am J Trop Med Hyg*. 2010; 82:838-845.

- Di Noia JD, Buscaglia CA, De Marchi CR, et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Experim Med*. 2002; 195:401–413.

- Flores CM, Cruz I, Rodriguez M, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2010; 28:284–293.

- Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*. 2003; 202:1-36.

- Gamboa LR, Gonzalez RC, Padilla RN, et al. Do commercial serologic tests for *Trypanosoma cruzi* infection detect mexican strains in women and newborns? *J Parasitol*. 2011; 97:338–343.

- Gascón J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010; 115:22–27

González TMI, Rojo P, Flores CM. Enfermedad de Chagas. Prevención de la infección en el recién nacido. *An Pediatr Contin*. 2008; 6:369-374.

- Grant IH, Gold JW, Wittner M et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med*. 1989; 111:849-851.

- Gürtler RE, Kitron U, Cecere MC et al. Sustainable vector control and management of Chagas disease in the Gran Chaco, Argentina. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104:16194-16199.

- Guzmán^a BC, Gracia GL, Floriani VJ, et al. Riesgo de transmisión de *Trypanosoma cruzi* por transfusión de sangre en México. Rev Panam Salud Pública. 1998; 42: 94-98.

- Guzmán^b C, Lahuerta S, Velasco O. Chagas disease. First congenital case report. Arch Med Res. 1998; 29:195-196.

- Hernández JL, Rebollar TEA, Infante F, et al. Indicadores de infestación, colonización e infección de *Triatoma dimidiata* (Latreille) (Hemiptera:Reduviidae) en Campeche, México. Neotrop Entomol. 2010; 39:1024-1031

Ismail SO, Paramchuk W, Yasir A, et al. Molecular cloning and characterization of two iron superóxido dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1997; 86:87-97.

- Jackson Y, Chappuis F, Loutan L. Chagas disease in Switzerland: managing an emerging infection and interrupting its transmission. Rev Med Suisse. 2008; 4:1212–1214.

- Jiménez CE, Campos VG, Cortes CA, et al. Maternal fetal transmission of *Trypanosoma cruzi*: A problem of public health little studied in Mexico. Exp Parasitol. 2012; 131:425-432.

- Kinoshita YAT, de Ornelas TMJ, Marques S, et al. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: Case Report. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 2009; 51:295-298.

- Kirchhoff LV, Paredes P, Lomelí GA, et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in United States. Transfusion. 2006; 46:298-304.

- Kitchen AD, Hewitt PE, Chiodini PL. The early implementation of *Trypanosoma cruzi* antibody screening of donors and donations within England: preempting a problem. Transfusion. 2012; 52:1931–1939.

- Koyoc CE, Medina BA, Escobedo OFJ, et al. Chicken coops, *Triatoma dimidiata* infestation and its infection with *Trypanosoma cruzi* in a rural village of Yucatan, Mexico. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2015; 57:269-272.

- Kropf SP. Carlos Chagas y la ciencia en Brasil: entre el laboratorio y el debate público. Rev Biomed. 2009; 20:246-263.

- Langhi DM Jr, Bordin JO, Castelo A, et al. The application of latent class analysis for diagnostic test validation of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors. Braz J Infect Dis. 2002; 6:181–187.

- Leiby DA, Herron RM Jr., Read EJ, et al. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion*. 2002; 42:549-555.

Leiby DA, Wendel S, Takaoka DT, et al. Serologic testing for *Trypanosoma cruzi*: comparison of radioimmunoprecipitation assay with commercial available indirect immunofluorescence assay, indirect hemagglutination assay, and enzyme-linked immunosorbent assay kits. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:639-642.

- Levine ND, Corliss JO, Cox FEG, et al. A newly revised classification of the protozoa. *J Protozol*. 1980; 27:37-58.

- Longoni SS, López CA, Sánchez MM, et al. Detection of different *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* antibodies in cats from Yucatán Península (México) using an iron superoxide dismutase excreted as antigen. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2012; 35:469-76.

- López A, Villagrán E, Briceño K, et al. *Trypanosoma cruzi*: seroprevalence detection in suburban population of Santiago de Querétaro (Mexico). *Scientific World J* 2012: 914129.

- Marín C, Hitos AB, Rodríguez I et al. *Phytomonas* iron superoxide dismutase: a possible molecular marker. *FEMS Microbiol Lett*. 2004; 234:69-74.

- Marín SC, Longoni S, Urbano J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for superoxide dismutase-excreted antigen in diagnosis of sylvatic and andean cutaneous leishmaniasis of Perú. *Am J Trop Med Hyg.* 2009; 80:55-60.

Marín C, Sánchez MM. Excreted/secreted antigens in the diagnosis of Chagas Disease. En: Jirillo E, & Brandonisio O. (Ed), *Immune response to parasitic infections.* Bentham Science Publishers Ltd. Sharjah, U.A.E. 2010.

Marín C, Concha F, Cañas R, et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody detection in eastern Andalusia (Spain). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2014;108: 165–172.

- Martínez IJA, Grant GY, Morales CZY, et al. Importance of species of Triatominae (Heteroptera: Reduviidae) in risk of transmission of *Trypanosoma cruzi* in western Mexico. *J Med Entomol.* 2008; 45:476-482.

- Mateo H, Sánchez MM, Marín C. Enzyme-linked immunosorbent assay with purified *Trypanosoma cruzi* excreted superoxide dismutase. *Clin Biochem.* 2010; 43:1257-1264.

- Matsumoto I, Maccioni M, Lee DM, et al. How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease. *Nature Immunol.* 2002; 3:360-365.

- Miles MA, Feliciangeli MD, De Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* 2003; 326:1444–1448.

- Ministerio de Salud. Real Decreto 1088/2005 del 16 de Septiembre, que establece los requisitos técnicos mínimos y condiciones para la donación de sangre para los Centros y Servicios de Transfusión de Sangre. *Boletín Oficial del Estado* de 2005; 225: 31288-31304.

- Moncayo A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98:577-591.

- 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.

- Moraes SH. Chagas infection transmission control: Situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94(Suppl. I):419-423.

- Muro A, López AJ, Ternavasio de la Vega HG, Pérez AJL. Infecciones por protozoos flagelados hemotisulares II. Enfermedad de Chagas. Tripanosomiasis africana. Medicine. 2010; 10:3632-3641.

- Navarro M, Navaza B, Guionnet A, López VR. Chagas disease in Spain: need for further public health measures. PLoS Negl Trop Dis. 2012; 6:e1962.

- Norma Oficial Mexicana. NOM-253-SSA1-2012. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos (modifica a la NOM-003-SSA2-1993, publicada en julio de 1994). Diario oficial de la federación. Secretaría de Salud, México.

- Novelo GBA, Benitez AG, Peña BA, et al. Detección de Trypanosoma cruzi en donadores de sangre. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2010; 48:139-144.

- Noya BA, Díaz BZ, Colmenares C, et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110: 377-386.

- Olivera MA, Guillén OF, Cruz VS et al. Serological and parasitological screening of *Trypanosoma cruzi* infection in mothers and newborns living in two chagasic areas of Mexico. Arch Med Res. 2006; 37:774-777.

- Oliveira I, Torrico F, Muñoz J, et al. Congenital transmission of Chagas disease: a clinical approach. Expert Rev of Anti-Infective Ther. 2010; 8:945-956.

- Ontañón AJ, Romon I, Amunarriz C, et al. Evaluation of a strategy for *Trypanosoma cruzi* screening and its impact on blood donation. XVIIth Regional Congress of the ISBT Europe. Vox Sang. 2007; 93:142.

- Pan American Health Organization (PAHO). Estimación cuantitativa de la Enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Panamericana de la Salud. OPS/HDM/CD/425-06. 2006. Washington DC.

Pan American Health Organization (PAHO). Estrategia y Plan de acción para la prevención, el control y la atención de la Enfermedad de Chagas. 62ª. sesión del Comité Regional. CD50.R17. 2010. Washington DC.

- Pan American Health Organization. Regional Consultation on organization and structure of health care for the sick or infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease). Chagas' disease: scientific and technical materials. 2014.

Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, et al. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. Mol Biochem Parasitol. 1997; 90:203-221.

- Patterson JS, Guhl F. Geographical Distribution of Chagas Disease. American Trypanosomiasis. Elsevier, London. 2010; pp. 83-114.

- Pereira BI, Nazareth C, Malcata L, Alves H et al. Infecções parasitárias transmitidas por transfusão de sangue. Qual o risco nos países não endémicos? Acta Med Port. 2011; 24:897-06.

- Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo Am, Franco RM, Dias VL, Pasos LA. Chagas' disease as a foodborne illness. J Food Protect. 2009; 72:441-446.

- Pérez Arellano JL. Chagas disease in Spain, 2012. Rev Clin Esp. 2012; 212:344–346.

- Piron M, Vergés M, Muñoz J, et al. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). Transfusion. 2008; 48:1862–1868.

- Ramírez SMJ, Herrera AM, Giurbière S, et al. Patterns of house infestation dynamics by non-domiciliated *Triatoma dimidiata* reveal a spatial gradient of

infestation in rural villages and potential insect manipulation by *Trypanosoma cruzi*.
Trop Med Int Health. 2010; 15:77-86.

- Ramos LA, Ramírez SME, González HJC, et al. Prevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en donadores de sangre del IMSS, Orizaba, Veracruz, México. Salud Publica Mex. 2006; 48:13-21.

- Ramsey JM, Alvear AL, Ordoñez R, et al. House infestation and risk factors associated with *Triatoma pallidipennis* in the Cuernavaca metropolitan area, Mexico. Med Vet Entomol. 2005; 19:219-228.

- Ramsey JM, Peterson AT, Carmona CO, et al. Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015; 110: 339-352

- Rassi AJr, Rassi A, Marín NJA. Chagas disease. Lancet. 2010; 375:1388-1402.

Rendell VR, Gilman RH, Valencia E, et al. *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant women without vector exposure have higher parasitemia levels: implications for congenital transmission risk. Plos One. 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0119527

- Salas NA, Postigo JR, Schneider D et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. Acta Trop. 2012; 124:87-91.

- Sánchez B, Monteón V, Reyes PA, et al. Standardization of micro-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Western blot for detection on *Trypanosoma cruzi* antibodies using extracts from mexican strains as antigens. Arch Med Res. 2001; 32:382-88.

- Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion. 1991; 31(6):547-57.

- Schmunis GA, Zicker F, Brandling BD. Risk for transfusion-transmitted infectious disease in Central and South America. Emerg Infect Dis. 1998; 4(1):5-11.

- Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94 (Suppl. I):93-101.

- Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the blood supply in Latin America. Clin Microbiol Rev. 2005; 18:12-29.

- Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: role of international migration. Memorias Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102:75-86.

- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends in Parasitol I. 2006; 22: 583-588.

- Schofield CJ, Galvao C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop. 2010; 110: 88–100.

- Sosa S, Gamboa M, del Cid J, et al. Short report: Use of a rapid test on umbilical cord blood to screen for *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant women in Argentina, Bolivia, Honduras, and Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2008; 79:755-759.

- Strasen J, Williams T, Ertl G, et al. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. Clin Res Cardiol. 2014; 103:1-10.

- Thrusfield M. Veterinary epidemiology, 4th edn. Oxford;Blackwell Science; 2005.
- Toso MA, Vial UF, Galanti N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. Rev Med Chile. 2011; 139:258-266.

- Triana O, Ortiz S, Dujardin JC, et al. Trypanosoma cruzi: Variability of stocks from Colombia determined by molecular karyotype and minicircle Southern blot analysis. Exp Parasitol. 2006; 113:62–66.

- Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N Jr, et al. Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996; 34:2143–2147.

- Urbina J, Concepción J, Caldera A, et al. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother. 2004; 48: 2379-2387.

- Valdez TA, Huicochea GL, Ortega CJ, et al. Social Representations and practices towards triatomines and Chagas disease in Calakmul, México. Plos One 2015a; DOI:10.1371/journal.pone.0132830, 1 / 28

- Valdez TAR, Huicochea GL, Ortega CJ, et al. La vulnerabilidad humana a la transmisión vectorial de *Trypanosoma cruzi* a través de los procesos de salud-enfermedad y la apropiación social del territorio. Salud Colect 2015b; 11:191-210.

- Villagrán ME, Marín C, Rodríguez-González I et al. Use of an iron superoxide dismutase excreted by *Trypanosoma cruzi* in the diagnosis of Chagas disease: seroprevalence in rural zones of the state of Queretaro, Mexico. Am J Trop Med Hyg. 2005; 73:510-516.

- Villalba R, Fornés G, Alvarez MA et al. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. Clin Infect Dis. 1992; 14:594-95.

- Vissoci REM, Cavazzana M, Okamura H, et al. Evaluation of the Western blot in the confirmatory serologic diagnosis of Chagas disease. Am J Trop Med Hyg. 1998; 59:750-756.

- World Health Organization (OMS). Utilization and supply of human blood and blood products. Twenty-eighth World Health Assembly. Resolution.WHA28.72. 1975. WHO, Geneva, Switzerland.

- WHO (OMS). 2006. Estimación Cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. En: OPS/HDM/CD/425-06.

- World Health Organization (OMS). Chagas Disease: Control and Elimination. <http://www.who.int/tdr/en/> (Consultado 19 de noviembre del 2014).

- WHO (OMS) Chagas disease (American trypanosomiasis). World Health Organization fact sheet N° 340. March 2015.

Yadón ZE, Schmunis GA. Congenital Chagas disease: estimating the potential risk in the United States. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81:927-33