

Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada

María Flores-Chávez, Isabel de Fuentes, Teresa Gárate y Carmen Cañavate

Servicio de Parasitología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda (Madrid). España.

La enfermedad de Chagas, o tripanosomiasis americana, es una parasitosis generalmente silenciosa y de evolución lenta. En España, como consecuencia de la creciente inmigración, se ha constituido en una infección importada y emergente. Por ello, el diagnóstico de laboratorio, parasitológico y serológico requiere una evaluación crítica dentro del marco de la información clínica y epidemiológica.

Aunque en nuestro entorno ya se han descrito casos agudos, la mayoría de los afectados se diagnostican en la etapa crónica de la infección. Como no existe una técnica de referencia o "patrón de oro", el diagnóstico serológico se basa en la concordancia entre diferentes pruebas de principios y antígenos distintos, que requieren un adecuado control de calidad para conseguir resultados óptimos. En esta revisión se describen las herramientas parasitológicas y serológicas utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, teniendo en cuenta los factores que afectan a sus ventajas y sus limitaciones.

Palabras clave: Enfermedad de Chagas. Diagnóstico. Serología. Microscopía. Cultivo. PCR.

Laboratory diagnosis of imported Chagas' disease

Chagas' disease, or American trypanosomiasis, is a silent parasitosis with a slowly-progressive course. In Spain, due to the rise in immigration, Chagas' disease has become an imported infection with characteristics of an emergent problem. Therefore, parasitological and serological diagnoses require critical evaluation from both clinical and epidemiological perspectives. Although some fatal acute cases have been reported, almost all the infected individuals diagnosed are in the chronic phase. In the absence of a gold standard diagnostic test, serological detection is based on analysis of the concordance index between different antigens and assays, which requires

suitable quality control procedures to achieve optimal results. This review describes and discusses the advantages and limitations of the parasitological and serological tests routinely used in Spain.

Key words: Chagas' disease. Diagnosis. Serology. Microscopy. Culture. PCR.

Introducción

La tripanosomiasis americana o enfermedad de Chagas es una infección parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. En zonas endémicas es una zoonosis/antropozoonosis en la que la vía principal de transmisión es vectorial. Los insectos hematófagos de la familia *Reduviidae* infectados transmiten la infección por las deyecciones que realizan cuando se alimentan de sangre. El acto reflejo de rascado lleva los parásitos, que están en las deposiciones (heces u orina del reduvido), hasta el punto de la lesión ocasionada por la picadura del insecto o hasta las mucosas u otras abrasiones de la piel (véase ciclo con animación en portal de la Organización Mundial de la Salud [OMS]¹). Las vías alternativas de transmisión más frecuentes son: *a*) la transfusional, vía principal en zonas no endémicas, y *b*) la vertical o congénita, de similar incidencia tanto en zonas endémicas como no endémicas. Las vías secundarias, menos frecuentes, son: *a*) por trasplante de órganos sólidos; *b*) por consumo de alimentos contaminados con las deyecciones del insecto vector o carne poco hecha de mamíferos infectados; esta vía se asocia a brotes puntuales en población con relación muy estrecha o familiar, y *c*) por accidentes de laboratorio, principalmente por el manejo de agujas contaminadas con el parásito^{2,3}.

La enfermedad de Chagas está ampliamente distribuida desde el sur de EE. UU. hasta el sur de Chile y Argentina. Se desconoce el número exacto de infectados, si bien se estima que afecta, aproximadamente, a 12 millones de personas. El descenso en la prevalencia, observado en los últimos años, se asocia a la interrupción de la transmisión vectorial intradomiciliaria, en el total de las zonas endémicas de Uruguay, Chile y Brasil, certificadas por la Organización Panamericana de la Salud (OPS) en 1997, 1999 y 2006, respectivamente, y con los programas de control en marcha de Argentina, Paraguay y Bolivia⁴. Por otro lado, también contribuye a la reducción de casos la cobertura de cribado serológico en bancos de sangre, que ronda el 100%, excepto en algunos países como Bolivia. Es importante destacar que no se ha descrito la enfermedad en la República Dominicana y Cuba⁵.

Los autores agradecen el apoyo financiero del Fondo de Investigación Sanitaria (RETIC-RICET, RD06/0021/0009 y RD06/0021/0019). María Flores disfrutó de una beca de la Agencia Española de Cooperación Internacional (AECI).

Correspondencia: Dra. C. Cañavate.
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, Km 2. 28220 Majadahonda (Madrid). España.
Correo electrónico: ccanave@isci.iii.es

Agente patógeno y formas evolutivas

Trypanosoma cruzi es un protozoo flagelado de la familia *Kinetoplastidae* que se caracteriza por la presencia de una mitocondria de gran tamaño denominada kinetoplasto. Tiene, principalmente, 3 formas evolutivas: el tripomastigote (forma infecciosa para el hospedador definitivo y el vector), el epimastigote (forma de multiplicación en el vector y en cultivo) y el amastigote (forma de multiplicación en el hospedador vertebrado y en cultivos celulares).

Variabilidad genética y su impacto en la epidemiología

Las cepas aisladas de *T. cruzi* presentan una gran variabilidad genética que se estudió mediante diferentes herramientas biológicas, bioquímicas y moleculares. Debido a la falta de un consenso inicial, estos aislados han recibido diferentes denominaciones⁶ que han llevado a una gran confusión. Para conocer la equivalencia entre las diferentes denominaciones, es conveniente revisar las recomendaciones acordadas en 1999 por los expertos que investigan en esta área de trabajo⁷, así como las revisiones realizadas por Momen⁸, Campbell et al⁹ y De Freitas et al¹⁰. El análisis global de los diferentes estudios de caracterización han confirmado los tres grandes zimodemas (Z1, Z2 y Z3) descritos, inicialmente, por Miles et al¹¹. Los zimodemas Z1, Z2 y Z3A¹² son equivalentes a los grupos *T. cruzi* I, *T. cruzi* III y *T. cruzi* III, respectivamente. Las dos primeras equivalencias están ampliamente aceptadas y consensuadas⁷, la tercera es un postulado reciente¹⁰. Según Brise et al¹³, *T. cruzi* I corresponde a cepas de menor heterogeneidad; las cepas caracterizadas como *T. cruzi* II y *T. cruzi* III constituyen un mismo grupo *T. cruzi* II, que a su vez contiene 5 subdivisiones: *T. cruzi* IIa, IIb, IIc, IID y IIe (tabla 1).

Debido a la complejidad antes mencionada, aún no se ha establecido una asociación bien definida entre los genotipos de *T. cruzi* y la evolución de la infección humana; si bien está mejor documentada su relación geográfica. En líneas generales, *T. cruzi* I se asocia al ciclo selvático de transmisión, ha sido aislado de mamíferos marsupiales del género *Didelphys* (zarigüeyas) y reducidos de la tribu *Rhodniini*, se localiza en hábitat con presencia importante de palmeras y circula, principalmente, en países de Norteamérica, Centroamérica y el norte de Sudamérica. Se detecta con mayor frecuencia en casos de infección aguda y en las formas cardíacas de la infección crónica. Por otro lado, *T. cruzi* II predomina en el ciclo doméstico, se ha ais-

lado a partir de mamíferos terrestres y reducidos de la tribu *Triatomini*, circula mayoritariamente en países del cono sur de Sudamérica y se identifica tanto en infecciones agudas como crónicas, en casos de cardiopatías y formas digestivas (megaesófago y megacolon). Con respecto a las cepas *T. cruzi* III, circulan en el ciclo enzoótico, han sido aisladas a partir de diferentes mamíferos terrestres, comparten nichos ecológicos con *T. cruzi* I y II, se extienden principalmente por el Amazonas y se asocian a parasitemias menores e infecciones de menor gravedad. Las cepas caracterizadas como híbridos *T. cruzi* IID y IIe circulan en algunos países del cono sur de Sudamérica y las cepas *T. cruzi* IIa, que se aíslan con menos frecuencia, generalmente circulan en el ciclo enzoótico^{9,10,14}.

Algunos estudios han demostrado que la variabilidad genética de *T. cruzi* tiene impacto en la variabilidad antigénica y puede influir en el diagnóstico de la infección¹⁵.

Fases de la enfermedad

Las manifestaciones clínicas observadas en los individuos infectados por *T. cruzi* son diversas; varían desde formas asintomáticas hasta sintomáticas graves, e incluso de consecuencias fatales. Es importante destacar que el período inicial, después del ingreso del parásito, puede durar desde 2 semanas (cuando se adquiere la infección por las heces contaminadas del vector) hasta varios meses (cuando se adquiere el parásito por una transfusión sanguínea) (fig. 1). Este período se conoce como fase aguda de la infección. En esta etapa, se observan síntomas en el 1-5% de los infectados; en zonas endémicas, los signos clásicos según la puerta de entrada, son el signo de Romana y el chagoma de inoculación. La fiebre de curso prolongado es característica en los casos de transfusión, y el distrés respiratorio y la hepatoesplenomegalia, en los casos de transmisión vertical. En general, los síntomas son muy inespecíficos, y en ocasiones se confunden con un resfriado común. Suele observarse cuadros de miocarditis que remiten de forma favorable y espontánea en la mayoría de los casos. Es menos común observar casos de meningitis, que en el 50% de éstos puede ser fatal. Una vez superada esta etapa, si el individuo infectado no ha sido tratado pasa a la fase crónica de la infección. Durante décadas, o de por vida, el individuo afectado puede permanecer asintomático, forma indeterminada de la infección. Aproximadamente, el 30-50% de la población infectada evoluciona a formas sintomáticas y las manifestaciones clínicas pueden ser de diferente grado de gravedad (formas cardíacas, formas digestivas –megaesófago y megacolon–, formas neurológicas) e incluso fatales (muerte súbita)^{2,9}.

TABLA 1. Equivalencia de los genotipos de *Trypanosoma cruzi*

Designación							Referencia
Zimodema	Z1	Z2			Z3		11
Linaje	2	1	1/2 ^b	1/2 ^b	ZIIIA	ZIIIB	12
DTU ^a	Tc I	Tc IIb	Tc IID	Tc IIe	Tc IIc	Tc IIa	6
Grupo	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II					13
Linaje ancestral	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II					7
			híbridos		<i>T. cruzi</i> III	(?)	10

^aDTU: unidades discretas de tipificación; ^b1/2: aislados con características del linaje 1 y el linaje 2.

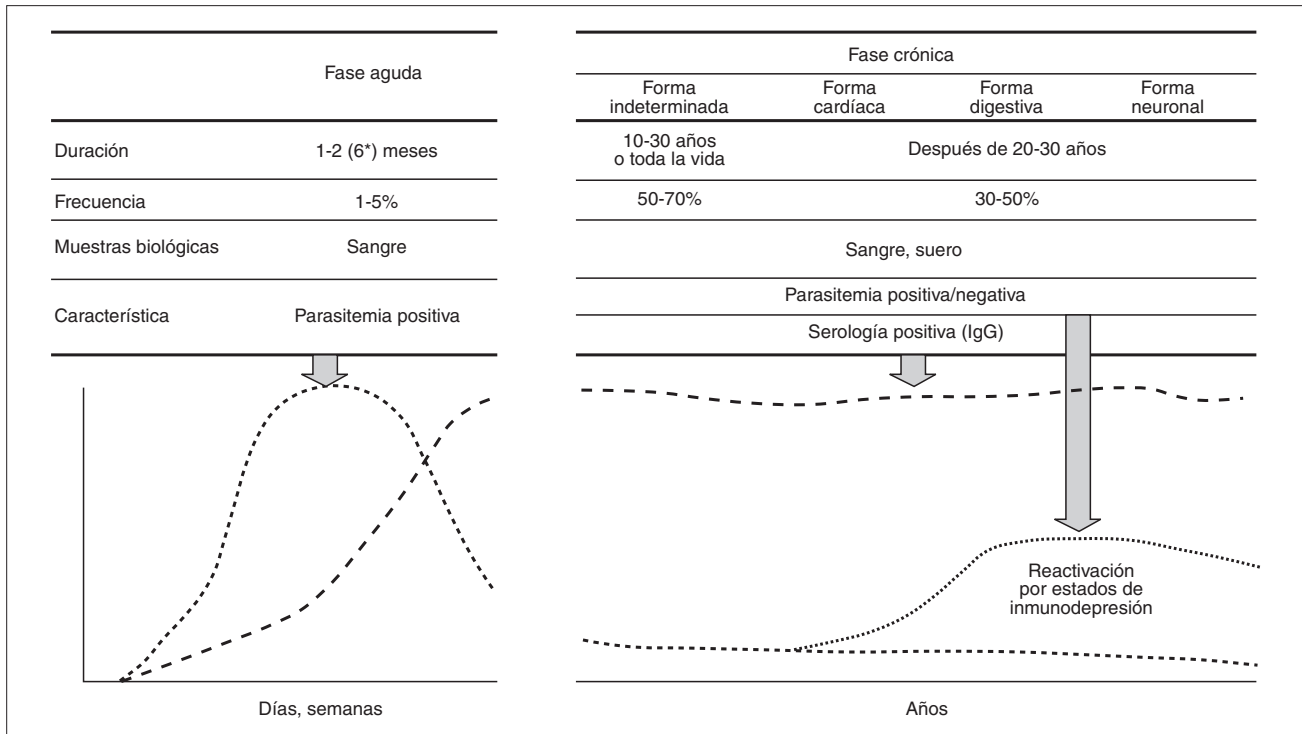


Figura 1. Relación de la dinámica de la parasitemia (línea de puntos) y los anticuerpos IgG anti-*Trypanosoma cruzi* (línea discontinua) en la infección por *T. cruzi*. *La duración de la fase aguda en la infección por transfusión sanguínea puede ser algo mayor al observado en la infección natural².

Principales grupos de riesgo

Teniendo en cuenta las características de la enfermedad, en nuestro entorno, la probabilidad de detectar casos agudos es baja. Sin embargo, se puede sospechar en los individuos receptores que hubiesen sido transfundidos con hemoderivados sanguíneos o trasplantados de órgano sólido, de donantes procedentes de áreas endémicas. Hasta la fecha, en España, se han descrito 2 casos agudos de consecuencias fatales debido a transfusión sanguínea contaminada^{16,17}. Desde 2005, es obligatorio realizar una prueba validada para descartar la infección por *T. cruzi* en donantes de sangre de riesgo (Real Decreto 1088/2005¹⁸). Algunas comunidades, como Valencia, Cataluña, Madrid, Asturias, País Vasco, Galicia, Andalucía y Cantabria, ya han iniciado protocolos de cribado serológico. La seroprevalencia media en donantes de sangre de riesgo, observada hasta la fecha, ronda el 1%¹⁹.

Los recién nacidos de madres latinoamericanas seropositivas pueden cursar también la etapa aguda de la enfermedad. En Barcelona, se ha descrito un caso de transmisión congénita con evolución favorable gracias a la administración temprana de tratamiento específico²⁰. Por ello, el cribado serológico de gestantes procedentes de zonas endémicas es fundamental para realizar un diagnóstico precoz de la infección congénita. Estudios preliminares en Barcelona y Valencia han descrito una seroprevalencia en estas gestantes del 1-2%^{21,22}.

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

por transfusión sanguínea y congénita. Actualmente, las consultas de enfermedades tropicales están siguiendo y tratando casos clínicos de cardiopatías y formas digestivas. Un estudio en Barcelona indica una seroprevalencia en inmigrantes latinoamericanos próxima al 37%²³, y otro estudio en Valencia reporta el 20,8%²⁴.

El riesgo de infección tras un viaje a una zona endémica es relativamente bajo, debido a que el viajero, por lo general, suele pernoctar en edificaciones bien construidas. Sin embargo, es importante destacar que la permanencia prolongada en un área rural o en zonas selváticas (Amazonas) implica introducirse en los ciclos de transmisión doméstico y enzoótico de *T. cruzi*, respectivamente.

Diagnóstico de laboratorio

Para realizar un diagnóstico de laboratorio apropiado es conveniente tener la información sobre la etapa de la infección que se sospecha. Es decir, si se trata de una infección aguda o reciente, es recomendable agotar las herramientas que permitan detectar al parásito. En cambio, si el individuo se encuentra en la etapa crónica, el diagnóstico de laboratorio se basará, principalmente, en la determinación de anticuerpos. También es aconsejable que, para seguir la evolución de la infección en el paciente, aunque no haya recibido tratamiento, se realice tanto la detección de anticuerpos como la del parásito, en especial en estados de inmunodepresión. El conjunto de los resultados de ambas aproximaciones permite valorar con mayor precisión la evolución del individuo. Cabe indicar nuevamente que esta infección es de evolución lenta, por lo que el seguimiento de los individuos infectados puede durar de

10 a 20 años, e incluso toda su vida. Actualmente, se recomiendan controles anuales.

Diagnóstico parasitológico

La detección tradicional de *T. cruzi* se realiza mediante la observación directa de los tripomastigotes en una muestra de sangre, ya sea en un examen en fresco, en una extensión o gota gruesa teñida con Giemsa o después de realizar la prueba de Strout²⁵⁻²⁸. Este último procedimiento consiste en concentrar los parásitos a partir de 3 ml de sangre recogida sin anticoagulante, con incubación a 37 °C durante 1 h para que se retraiga el coágulo y los tripomastigotes queden suspendidos en el sobrenadante. Tras varios ciclos de centrifugación, primero para eliminar los hematíes residuales y luego para concentrar los parásitos, se analiza el sedimento a 400×²⁵. Una variante de este procedimiento y de gran utilidad para el diagnóstico de infecciones congénitas es la técnica del tubo capilar heparinizado o microhematocrito; esta prueba consiste en el análisis del movimiento de los parásitos en la interfase entre el paquete de hematíes y el plasma de 4 a 6 capilares²⁹⁻³¹. Para la identificación morfológica y la diferenciación con *T. rangeli*, es necesario analizar las preparaciones teñidas con Giemsa. Los tripomastigotes de *T. cruzi* se caracterizan por un kinetoplasto prominente, que da la sensación de estar pintado por encima del cuerpo del parásito. Sin embargo, no se puede descartar la dificultad de la diferenciación morfológica de estas 2 especies; por ello, en estos casos es aconsejable recurrir a técnicas moleculares³²⁻³⁴. No obstante, este inconveniente se da principalmente en la fase aguda de la infección y en zonas en las que ambos protozoos son coendémicos³⁵.


Cuando la parasitemia es baja, característica de la etapa crónica, es imprescindible recurrir a técnicas que permitan amplificar la presencia del parásito, o de alguno de sus componentes. Un procedimiento que posibilita alcanzar este objetivo es el xenodiagnóstico. Esta prueba consiste en utilizar 40 reduvidos repartidos en 2 frascos cubiertos con una malla de tela, que se colocan en la parte interna de los brazos o las piernas del paciente, durante 30 min. En este período, los triatominos que se mantuvieron en ayunas se alimentan de la sangre del paciente. Después de 30, 60 y 90 días, se analizan las heces u orina de los insectos en búsqueda de tripomatigotes metacíclicos en movimiento. Esta técnica se ha modificado a lo largo de los años, y actualmente se puede realizar de forma artificial con la misma sensibilidad que un xenodiagnóstico tradicional; de esta manera se evita la exposición directa del paciente a los triatominos. La cantidad de sangre periférica que se emplea es similar a la ingerida por los insectos en la forma tradicional; para alcanzar un rendimiento óptimo es necesario que se procese de forma inmediata, o en 4 h, después de su obtención. Con la optimización del xenodiagnóstico artificial se ha conseguido evitar que el paciente sufra la picadura de los 40 triatominos, aunque el resultado sigue obteniéndose 30 a 90 días después de la alimentación de estos insectos. Algunos investigadores han introducido la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para detectar al parásito y así aumentar su sensibilidad y reducir el tiempo a 30 días³⁶.

Otro recurso que permite multiplicar el número de parásitos a partir de una muestra de sangre es el cultivo. Durante la fase aguda es posible cultivar volúmenes pequeños de muestra en medio NNN tradicional. Cuando la infección alcanza la etapa crónica, el rendimiento es óptimo cuando se utiliza hasta 30 ml de sangre, en series de 2 a 3 réplicas realizadas en días distintos, y el procesamiento es inmediato³⁷. La sangre recogida con anticoagulante se centrifuga para separar el paquete de hematíes y el plasma que contiene las células blancas y las plaquetas. Los hematíes después de un lavado con medio LIT (*liver infusion tryptose*) se distribuyen en 6 tubos que contienen 3 ml de medio LIT. Por otro lado, las células suspendidas en el plasma se concentran mediante un ciclo de centrifugación y después se cultivan con 3 ml de medio LIT. Todos los tubos se mantienen a 27 °C y se revisan semanalmente. Dependiendo de la parasitemia inicial, el tiempo para considerar la prueba negativa es de 180 días. Tanto el xenodiagnóstico como el hemocultivo, además de su interés diagnóstico, son herramientas de gran utilidad para el aislamiento de cepas de *T. cruzi* y posteriores estudios de genética de poblaciones.

Otra opción para la detección de *T. cruzi* es la inoculación en ratones que, aunque se emplea principalmente en investigación³⁸, se utilizó con éxito como herramienta diagnóstica en casos agudos²⁸ y también en pacientes crónicos coinfectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)³⁹.

La detección de antígeno en orina y suero, mediante ensayos de captura en formato ELISA, se ha descrito con resultados prometedores para el diagnóstico de la infección aguda y congénita⁴⁰, e incluso en casos crónicos. Sin embargo, no se han desarrollado más avances con esta metodología.

En los últimos años, la detección de ADN mediante la PCR se ha constituido en la alternativa más accesible cuando se carece de personal especialista en la identificación y diferenciación morfológica de *T. cruzi*, con respecto a otros tripanosomátidos que circulan en coendemicidad. Aunque su ejecución requiere un tiempo mayor al empleado en una observación directa, es inferior al necesario para la detección de la presencia de parásitos mediante xenodiagnóstico y hemocultivo. Existen numerosas dianas moleculares que permiten la detección específica de *T. cruzi*; en la figura 2 se resumen las aproximaciones más representativas que se han abordado^{32-34,40-51}. En diagnóstico, las dianas más utilizadas son el minicírculo del kADN⁴⁶ y la secuencia repetida de ADN satélite^{33,52}. Como ambas se encuentran representadas en un número de copias muy similar (10⁴ copias), las diferencias en el límite de detección dependen de la optimización de cada reacción. En los 2 protocolos de PCR, es posible conseguir la detección inequívoca del contenido genómico de un solo parásito, e incluso cantidades inferiores. En general, el límite de detección depende del número de repeticiones del blanco de amplificación, las condiciones de la reacción, la variabilidad de la parasitemia, y el tipo y cantidad de muestra biológica. En zonas endémicas, la PCR, desde el punto de vista diagnóstico, sólo se utiliza en estudios de investigación. En los países no endémicos, la PCR es una herramienta que se emplea en situaciones puntuales, como por ejemplo en el seguimiento de una sospecha de infección por transfusión sanguínea o trasplante, la reactivación de una



Diana	Iniciación	Tamaño del amplificado	Ref.
ADN satélite	Tcz1, Tcz2	195 pb	23
	Díaz1, Díaz2	195 pb	41
Familia E113	O1, O2	220 pb	43
Sec. rep. moderada	C6s-C6r	344 pb	47
ADN telomérico	T189Fw2, Tc189Rv3	189 pb	34
24S alfa-rARN	D71, D72	110, 125 pb	50
18 SSU-rARN	V1, V2	165, 175 pb	49
ITS	ITS1, ITS2	1,2; 1,7; 1,2-1,4 kb	51
	TC, TC1, TC2	300; 350 pb	6
Minixión	TCC, TC1, TC2, TC2'	300; 350; 250 pb	53
	Proteína flagelar	BP1-BP2	692 pb
ORF proteína flagelar	FPS	177 pb	42
Proteína Tc24	T1, T2	636 pb	45
Minicírculo	S35-S36	330 pb	32
	S34, S67, S35, S36	83; 123; 330 pb	48
	121-122	330 pb	46

Figura 2. Dianas de diagnóstico y caracterización molecular de *Trypanosoma cruzi*. SSU-rRNA: gen del ARN ribosomal de la subunidad pequeña del ribosoma; ITS: espaciadores intergénicos del gen del ARN ribosomal; N: núcleo; K: kinetoplasto.

infección crónica tras un trasplante, en el diagnóstico y confirmación de un Chagas congénito, y en el seguimiento de una infección accidental. En la fase crónica, la PCR es, además, una prueba complementaria, y es útil como criterio parasitológico de seguimiento del tratamiento tripanomicida.

Además del diagnóstico, la PCR se utiliza en la caracterización de *T. cruzi*. Para este análisis, las dianas mejor estudiadas son el gen del minixión^{6,53}, los genes del ARN ribosomal^{49,50}, los espaciadores intergénicos⁵¹ (ITS) y la región variable del minicírculo del kADN. Como se ha explicado anteriormente, aunque la clasificación taxonómica de *T. cruzi* está todavía en discusión, el análisis individual o combinado de estas dianas permite discriminar las diferentes subdivisiones de *T. cruzi*. Además, mediante las variantes PCR-RFLP (polimorfismo por digestión enzimática del ADN amplificado), TGGE (polimorfismo en gradiente de temperatura) o LSSP-PCR (polimorfismo de la amplificación del amplicón utilizando un solo oligonucleótido), se puede evaluar la variabilidad genética en cada una de las subdivisiones de *T. cruzi*.

La PCR cuantitativa en tiempo real todavía no está muy introducida en el diagnóstico habitual, debido a que la determinación de la carga parasitaria es útil, principalmente, en la etapa aguda y en el seguimiento de infecciones experimentales. Su utilización en el diagnóstico de la infección crónica tiene las mismas limitaciones que una PCR tradicional. Además, los parásitos no están siempre presentes en cada mililitro de la muestra de sangre²⁵. No obstante, mediante esta metodología se reduce el tiempo de visualización de los productos de amplificación. Algunos protocolos de PCR tradicional de diagnóstico y caracterización ya se han ajustado a esta tecnología^{54,55}, pero queda por estudiar con detenimiento sus posibles ventajas.

Una comparación de la sensibilidad y el límite de detección de las pruebas parasitológicas que se emplean en el diagnóstico de la infección aguda y crónica, se exponen en las tablas 2 y 3, respectivamente. Como se detalla en la tabla 2, en la infección aguda, la mayoría de las herramientas parasitológicas tiene un buen rendimiento. En cambio, en la infección crónica, aunque la PCR es superior en sensibilidad (tabla 3), los estudios de evaluación de la parasitemia durante el seguimiento de la evolución de pacientes tratados y no tratados, muestran que es necesario combinar la PCR con el xenodiagnóstico, o el hemocultivo, para demostrar la persistencia del parásito³⁶. Esta controversia probablemente es consecuencia de la variabilidad en la parasitemia y el tropismo tisular de *T. cruzi*. No obstante, si la muestra de sangre contiene un sólo parásito, mediante la aplicación de la PCR será posible detectarlo⁵⁶. Para aumentar la probabilidad de detección de ADN equivalente a un parásito en un caso de infección crónica, es recomendable procesar un mínimo de 10 ml de sangre en un adulto y 5 ml en un niño⁵⁷.

Diagnóstico serológico

El diagnóstico serológico se basa en la determinación de inmunoglobulinas (Ig) G totales anti-*T. cruzi*. Por cuestiones prácticas, se denomina convencional cuando se emplea como antígeno todo el parásito (inmunofluorescencia indirecta [IFI]) o una mezcla compleja de antígenos del parásito (hemoaglutinación indirecta [HAI], ensayos inmunoenzimáticos [ELISA]). El diagnóstico serológico es no convencional cuando los antígenos son purificados, recombinantes o péptidos sintéticos². Dentro de este último grupo, destacan las pruebas rápidas en formato de tiras inmunocromatográficas y la aglutinación en tarjeta; con este

TABLA 2. Técnicas de diagnóstico parasitológico aplicadas en infecciones agudas

Técnica	Volumen de sangre	N ^a	Sensibilidad (%)	Límite de detección ^b	Tiempo	Referencias
Observación en fresco (400×)	0,01 ml	15	80	2000 p/ml	10-60 min	29
		59	15			28
	0,0015 ml			400.000 p/ml	20 min	27
Extensiones teñidas	0,5 ml (12 preparaciones)	59	34			28
Gota gruesa			92		45 min	26
Microhematocrito	0,3 ml (50 µl × 6)	15	100	500 p/ml	10-60 min	29
	0,2 ml (50 µl × 4)	71	100	40 p/ml	> 10 min	30
Strout	3-5 ml		95		2 h	25,26
Xenodiagnóstico	2,5-5 ml ^c		100		30-60 días	26
Xenodiagnóstico artificial	3 ml	59	61		30-180 días	28
Cultivo de sangre	0,5 ml	59	53		1-8 semanas	28
	1 ml			200 p/ml	30 días	38
Inoculación en ratones	0,5 ml	59	29			28
	0,2 ml			10 p/ml	21-28 días	38
PCR ^d	0,1 ml	8	100	5 p/ml	6-8 h	52
	10 ml (200 µl)			0,1 p/ml		56
	2 ml (500 µl)			0,5 p/ml		36

PCR: reacción en cadena de la polimerasa:

^aNúmero de pacientes con infección aguda (adultos, recién nacidos).

^bDeterminado experimentalmente; p = parásito.

^cCálculo que se alcanza multiplicando el número de triatomíneos utilizados por el volumen aproximado de sangre que el insecto ingiere durante la realización de la prueba.

^dLa sangre colectada se mezcla, volumen a volumen, con tampón guanidina 6 M-EDTA 0,2 M pH 8; entre paréntesis se indica el volumen de lisado sangre-guanidina empleado en la extracción de ADN.

TABLA 3. Técnicas de diagnóstico parasitológico aplicadas en infecciones crónicas

Técnica	Volumen de sangre	N ^a	Sensibilidad (%)	Límite de detección ^b	Tiempo	Referencia
Microhematocrito	0,3 ml (50 µl × 6)	81	0		10-60 min	31
		29	VIH	6,9		
	0,2 ml (50 µl × 4)	35		0	> 10 min	29 30
Xenodiagnóstico	1-10 ml ^c		9-87,5		30-60 d	57
	Xenodiagnóstico artificial	81	7,4			31
Cultivo de sangre	10 ml	29	VIH	69		
	1-10 ml			0-97	hasta 180 días	57
	30 ml			25-94		
	30 ml	81		19,8	hasta 8 semanas	31
	30 ml	29	VIH	51,7		
PCR ^d	1 ml			200 p/ml	30 d	38
	5 ml (200 µl)	47			6-7 h	Nota ^e
	5 ml (500 µl)	96		45		Nota ^e
	10 ml (200 µl)	86		100		46
	15 ml (200 µl)	79		96,5		Nota ^e
	10 ml (200 µl)			83,5	0,1 p/ml	56
2 ml (500 µl)				0,5 p/ml	36	

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

^aNúmero de pacientes con infección crónica.

^bDeterminado experimentalmente; p = parásito.

^cCálculo aproximado que se alcanza multiplicando el número de ninfas utilizadas por el volumen de sangre que el insecto ingiere durante la realización de la prueba.

^dLa sangre colectada se mezcla volumen a volumen con tampón guanidina 6 M-EDTA 0,2 M pH 8; entre paréntesis se indica el volumen de lisado sangre-guanidina empleado en la extracción de ADN.

^eLas referencias se pueden encontrar en la revisión realizada por Portela-Lindoso et al⁵⁷.

tipo de ensayos se requieren de 10 a 15 min para obtener un resultado^{58,59}.

A pesar de los avances tecnológicos, ningún ensayo serológico alcanza el 100% de sensibilidad y especificidad, de manera que el diagnóstico serológico de certeza se basa

en la concordancia de, por lo menos, 2 técnicas de distinto principio y antígenos diferentes². Cuando los resultados son discordantes, es necesario realizar otras pruebas de confirmación y diagnóstico diferencial con otras enfermedades que pueden generar reacciones falsamente positi-

TABLA 4. Algunos ensayos comerciales disponibles en el mercado español para la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*

Casa comercial	Nombre de la prueba	Tipo de antígeno	Sensibilidad	Especificidad	Referencia
Biolink	<i>T. cruzi</i> HAI	Antígeno total			
LabClinics	Biognost®IFA	Epimastigotes			
Innogenetics	Kit Tripanosomiasis (MarDx)	Epimastigotes Corpus Christi			
Vitro	<i>T. cruzi</i> IgG ELISA (Cellabs)	Antígeno total			
Biolink	BLK Chagas test	Antígeno total			
Johnson&Johnson	Ortho- <i>T. cruzi</i> ELISA test system	Antígeno total	100	100	Nota ^a
Abbot	Certest (BiosChile)	Antígeno total	100	100	Nota ^a
Izasa	Biokit ELISA	TcD, TcE, PEP2, TcLo1.2	100	97,4-99,5	Nota ^a
DiaMed	ID-PaGIA	Ag2, TcD, TcE	96,8	94,6	59
Biolink	<i>T. cruzi</i> ICT (InBios)	TcD, TcE, PEP2, TcLo1.2			
Operon SA	Stick Chagas	TcD, TcE, PEP2, SAPA	99	95	Nota ^a
Chembio	<i>T. cruzi</i> ICT	B13, 1F8, H49	98,5-100	94,8-98,6	58
	Western blot	TESA	100	98,5	Nota ^b
	RIPA	Glucoproteína 72-90 kDa	100	100	Nota ^b

Ig. inmunoglobulina;

^aSegún datos del fabricante.

^bUn análisis de las limitaciones y las referencias se puede encontrar en la revisión realizada por Wendel⁵.

vas: leishmaniasis mucocutánea y visceral, malaria, sífilis, toxoplasmosis, hepatitis, lupus eritematoso sistémico, esquistosomiasis, artritis reumatoide, paracoccidiodomocosis, mononucleosis y enfermedades autoinmunitarias. Algunos investigadores postulan que la técnica de Western blot empleando antígenos de excreción-secreción (TESA *blot*) y la radioinmunoprecipitación de las glucoproteínas de 72 y 90 kDa (RIPA) podrían utilizarse como ensayos definitivos y de confirmación. Sin embargo, ambas pruebas están limitadas a centros especializados con infraestructura suficiente para el mantenimiento de las formas infecciosas en cultivo y la manipulación de radiactividad. Además, la mezcla de los antígenos de excreción y secreción (TESA) también puede variar entre lotes de producción, su elaboración limita su rentabilidad y su empleo no elimina la posibilidad de reacción cruzada con la leishmaniasis. Estos inconvenientes restringen su uso a un número reducido de muestras. En cuanto al RIPA, es la técnica de confirmación que se emplea, principalmente, en EE. UU. Estudios recientes indican que estos procedimientos también pueden presentar falsos negativos⁵.

Hace algunos años, en el mercado español no había muchas técnicas comerciales disponibles para la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Actualmente, se pueden encontrar *kits* comerciales que se basan tanto en antígenos totales como en antígenos recombinantes (tabla 4). Es difícil realizar una evaluación rigurosa de éstos para determinar cuál de ellos es el mejor. El rendimiento de estas pruebas depende de muchos factores que no siempre se miden en experimentos puntuales. Además, debido a la inexistencia de una técnica de referencia, los resultados pueden ser variables. Por ello, la valoración continua de los reactivos es fundamental. No obstante, a la hora de elegir una u otra técnica, es necesario considerar el objetivo del estudio y la infraestructura disponible. En cribados serológicos se debe optar por la técnica de mayor sensibilidad, por lo general en formato de ELISA, si bien algunos ensayos rápidos basados en aglutinación e inmunocromatografía también parecen alcanzar el mismo objetivo. En cambio, para el diagnóstico es conveniente combinar los ensayos convencionales entre sí, o con alguno de los métodos no convencionales de mayor especificidad. La mayoría de las

pruebas no convencionales, disponibles en el mercado español, se basa en epítomos antigénicos muy similares, por lo que la utilización de dos de estos reactivos para confirmar un diagnóstico no cumpliría la recomendación de la OMS, que es utilizar pruebas de principios distintos². Una descripción amplia de las características de los antígenos recombinantes se puede encontrar en la revisión de Da Silveira et al⁶⁰.

Muestras, condiciones y algunas consideraciones especiales

En la fase aguda se puede detectar el parásito a partir de sangre, suero, plasma, biopsias de tejido, líquido cefalorraquídeo, en especial, cuando la parasitemia es elevada. Para observar *T. cruzi* en movimiento, o aislarlo, es necesario que la muestra se analice de forma inmediata, en lo posible dentro de las 4-8 h posteriores a su obtención. Para esto, la muestra se puede conservar refrigerada o a temperatura ambiente (25 °C). En el caso de la PCR, estas limitaciones no son tan marcadas. Sin embargo, es conveniente que la muestra no sufra muchos cambios de temperatura y se conserve a 4 °C o congelada. En el caso de ser una muestra de sangre, es conveniente que se mezcle con tampón guanidina 6 M-EDTA 0,2 M, lo antes posible. De esta manera, se homogeniza el ADN del parásito, se inhibe las ADNasas, y se conserva la muestra, incluso a temperatura ambiente. Con este procedimiento, se consigue detectar hasta 1 parásito en 10 ml de sangre⁵⁶.

En el diagnóstico parasitológico de la infección congénita, la utilidad de la sangre del cordón es discutida por la posible contaminación con sangre materna. Sin embargo, una toma cuidadosa de la muestra, evitando la mezcla de ambas sangres, es menos invasiva para el recién nacido. También se ha demostrado que la detección de parásitos en la placenta y el líquido amniótico no se asocia a una infección congénita⁶¹. Por otro lado, debido a parasitemias bajas, es probable que no se detecte el parásito en el análisis inicial; por ello es conveniente realizar el seguimiento del neonato en el primer y séptimo mes de edad. A partir del séptimo mes, el diagnóstico se debe llevar a cabo me-

dante la determinación de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* por 2 pruebas serológicas validadas. No obstante, la evaluación de la cinética de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, durante los primeros 7 meses, que muestre una tendencia a la negativización, puede sugerir ausencia de infección. Por otra parte, mediante un estudio de casos y controles de recién nacidos infectados y no infectados, se demostró que la determinación de anticuerpos IgM o IgA no es útil para el diagnóstico. En ambos grupos de recién nacidos se detectaron las 2 clases de anticuerpos. Este hecho se explica como una respuesta frente a los antígenos de excreción secreción de *T. cruzi* que atraviesan la placenta⁶².

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

También es importante destacar que en zonas endémicas donde predomina *T. cruzi* I, suele circular *T. rangeli* que, aunque no es patógeno, es responsable de muchas reacciones cruzadas. Además en estas zonas, norte de Sudamérica y Centroamérica, la transmisión vectorial está menos controlada y muchos individuos presentan una infección aguda o reciente. Por otro lado, en estudios experimentales en modelo murino, durante el seguimiento de la evolución de la infección con 2 cepas de *T. cruzi* I, se observaron dinámicas diferentes en la parasitemia y la respuesta inmunitaria humoral⁶³. En la fase aguda, en el grupo de ratones infectados con la cepa de mayor virulencia in vitro, la parasitemia fue más elevada y la respuesta inmunitaria humoral fue patente en la fase crónica. Mientras que con la otra cepa de menor virulencia, la parasitemia fue más baja y se observó una seroconversión de positivo a negativo en ausencia de tratamiento.

Aunque es discutido, también se ha descrito la eliminación espontánea del parásito, curación espontánea⁶⁴, en algunos pacientes que no recibieron tratamiento específico. Estos antecedentes podrían explicar las discrepancias observadas en los resultados de las pruebas de diagnóstico serológico, así como la sensibilidad inferior de los ensayos comerciales fabricados en el cono sur en zonas con predominio de *T. cruzi* I.

Conclusiones

Teniendo en cuenta la gran variabilidad genética de *T. cruzi* y la complejidad de la enfermedad de Chagas, es lógico que el diagnóstico de laboratorio sea particular y presente connotaciones especiales. En España, al no contar con el vector que transmite la infección en circunstancias naturales, la mayoría de los afectados se encuentra en fase crónica. Además, al no existir una técnica de referencia o "patrón de oro" de diagnóstico, la detección de anticuerpos IgG, marcador principal en estos casos, requiere la realización de al menos 2 pruebas de principios y antígenos diferentes y un riguroso control de calidad que garan-

tice los resultados. Actualmente, es obligatorio el cribado serológico de donantes de sangre de riesgo, que garantice el control de esta vía de infección y que no sucedan más casos agudos. Sin embargo, aunque hay estudios en marcha sobre la transmisión congénita, no se puede evitar que ocurran casos congénitos. En estas situaciones, la correcta aplicación de las pruebas parasitológicas es fundamental para realizar la detección precoz de la infección, la administración temprana del tratamiento específico y la interrupción de la evolución de la enfermedad.

Bibliografía

1. WHO-TDR. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. [accedido 14 Jun 2007]. Disponible en: www.who.int/tdr/media/multimedia/lifecycle.htm. 2006.
2. Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Ginebra: WHO Press; 2003.
3. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14:659-88.
4. PAHO. OPS/OMS certifica a Brasil por haber logrado interrumpir la transmisión vectorial del mal de Chagas. [accedido 14 Jun 2007]. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/DD/PIN/ps060616.htm>. 2006.
5. Wendel S. Transfusion-transmitted American and African trypanosomiasis (Chagas disease and sleeping sickness): neglected or reality? *ISBT Science Series.* 2006;1:140-51.
6. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;83:141-52.
7. Anónimo. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Supl 1:429-32.
8. Momen H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Supl 1:181-4.
9. Campbell DA, Westenberger SJ, Sturm NR. The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics. *Curr Mol Med.* 2004;4:549-62.
10. De Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SM, et al. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2006;2:e24.
11. Miles MA, Cedillos RA, Povoaa MM, De Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet.* 1981;1:1338-40.
12. Mendonca MB, Nehme NS, Santos SS, Cupolillo E, Vargas N, Junqueira A et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. *Parasitology.* 2002;124:177-84.
13. Brisse S, Barnabe C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol.* 2000;30:35-44.
14. Miles MA, Feliciangeli MD, De Arias AR. American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies. *BMJ.* 2003;326:1444-8.
15. Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, Almeida IC, Frasch AC. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *J Exp Med.* 2002;195:401-13.
16. Villalba R, Fornes G, Álvarez MA, Roman J, Rubio V, Fernández M, et al. Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. *Clin Infect Dis.* 1992;14:594-5.
17. Fores R, Sanjuán I, Portero F, Ruiz E, Regidor C, López-Vélez R, et al. Chagas disease in a recipient of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007;39:127-8.
18. BOE. Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. [accedido 14 Jun 2007]. Disponible en: http://www.msc.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/legislacion/docs/RD_1088-2005.pdf 225, 31288-31304. 2005
19. Castro E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. *Enf Emerg.* 2006;8 Supl 1:48-50.
20. Riera C, Guarro A, Kassab HE, Jorba JM, Castro M, Angrill R, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg.* 2006;75:1078-81.
21. Del Pino M, Coll O. Enfermedad de Chagas, transmisión materno fetal y experiencia recogida en nuestro centro. *Enf Emerg.* 2006;8 Supl 1:37-9.
22. Gil-Brusola A, Giménez MJ, Gómez MD, García Y, Fagúndez G, Rosingh A, et al. Prevalencia de la enfermedad de Chagas en gestantes y población inmigrante de Sudamérica, estudio comparado. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2007;25 Supl 1:88.

23. Muñoz J, Treviño B, Vergés M, Clavería I, López-Chejade P, Salvadó E, et al. Enfermedad de Chagas importada en Barcelona. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25 Supl 1:87.
24. Parada C, Drecic MC, Tuset C, Aznar P, Segarra P, García M, et al. Seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en inmigrantes latinoamericanos atendidos en el Hospital General Universitario de Valencia. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2007;25 Supl 1:87.
25. Carlier Y, Luquetti A, Pinto-Dias JC, Truyens C, Kirchhoff L. Chagas disease (american trypanosomiasis). [accedido 14 Jun 2007]. Disponible en: <http://www.emedicine.com/med/topic327.htm>. 2003
26. Storino R. Consenso de enfermedad de Chagas, Topico I: Enfermedad de Chagas con parasitemia evidente. *Rev Arg Cardiol*. 2002;70 Supl 1:15-39.
27. Kirchhoff LV, Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol*. 1996;34:1171-5.
28. Anez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Gonzalez N, et al. Acute Chagas' disease in western Venezuela: a clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:215-22.
29. Freilij H, Muller L, González Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1983;18:327-30.
30. Torrico MC, Solano M, Guzmán JM, Parrado R, Suárez E, Alonzo-Vega C, et al. Estimation of the parasitemia in *Trypanosoma cruzi* human infection: high parasitemias are associated with severe and fatal congenital Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38 Suppl 2:58-61.
31. Sartori AM, Neto JE, Nunes EV, Braz LM, Caiiffa-Filho HH, Oliveira OC, Jr. et al. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*. 2002;186:872-5.
32. Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33:205-14.
33. Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1989;27:1477-82.
34. Chiurillo MA, Crisante G, Rojas A, Peralta A, Dias M, Guevara P, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10:775-9.
35. Saldana A, Samudio F, Miranda A, Herrera LM, Saavedra SP, Caceres L, et al. Predominance of *Trypanosoma rangeli* infection in children from a Chagas disease endemic area in the west-shore of the Panama canal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005;100:729-31.
36. Coronado X, Zulantay I, Reyes E, Apt W, Venegas J, Rodríguez J, et al. Comparison of *Trypanosoma cruzi* detection by PCR in blood and dejections of *Triatoma infestans* fed on patients with chronic Chagas disease. *Acta Trop*. 2006;98:314-7.
37. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvao LM. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2002;88:894-900.
38. Mortatti RC, Fonseca LS, Coelho J, Oliveira A, Moreno M. Follow-up of patient and subpatent parasitemias and development of muscular lesions in mice inoculated with very small numbers of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1992;75:233-9.
39. Braz LM, Amato N, Carignani FL, De Marchi CR. *Trypanosoma cruzi* parasitemia observed in immunocompromised patients: the importance of the artificial xenodiagnosis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2001;43:113-5.
40. Freilij HL, Corral RS, Katzin AM, Grinstein S. Antigenuria in infants with acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol*. 1987;25:133-7.
41. Diaz C, Nussenzweig V, Gonzalez A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *Am J Trop Med Hyg*. 1992;46:616-23.
42. Lane JE, Olivares-Villagómez D, Vnencak-Jones CL, McCurley TL, Carter CE. Detection of *Trypanosoma cruzi* with the polymerase chain reaction and in situ hybridization in infected murine cardiac tissue. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56:588-95.
43. Requena JM, Jiménez-Ruiz A, Soto M, López MC, Alonso C. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. *Mol Biochem Parasitol*. 1992;51:271-80.
44. Silber AM, Bua J, Porcel BM, Segura EL, Ruiz AM. *Trypanosoma cruzi*: specific detection of parasites by PCR in infected humans and vectors using a set of primers (BP1/BP2) targeted to a nuclear DNA sequence. *Exp Parasitol*. 1997;85:225-32.
45. Taibi A, Guevara-Espinoza A, Schoneck R, Yahiaoui B, Ouaiissi A. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology*. 1995;111:581-90.
46. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso MA, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;51:771-7.
47. Araya J, Cano MI, Gomes HB, Novak EM, Requena JM, Alonso C, et al. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*. 1997;115:563-70.
48. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1991;48:211-21.
49. Clark CG, Pung OJ. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;66:175-9.
50. Souto RP, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62:45-52.
51. Santos SS, Cupolillo E, Junqueira A, Coura JR, Jansen A, Sturm NR, et al. The genetic diversity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zymodeme 3, based on the internal transcribed spacer of the ribosomal gene. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96:755-64.
52. Russomando G, Figueredo A, Almiron M, Sakamoto M, Morita K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *J Clin Microbiol*. 1992;30:2864-8.
53. Fernandes O, Sturm NR, Derre R, Campbell DA. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998;95:129-33.
54. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129:53-9.
55. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int J Parasitol*. 2005;35:411-7.
56. Britto C, Cardoso MA, Wincker P, Morel CM. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1993;88:171-2.
57. Portela-Lindoso AA, Shikanai-Yasuda MA. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. *Rev Saude Publica*. 2003;37:107-15.
58. Luquetti AO, Ponce C, Ponce E, Esfandiari J, Schijman A, Revollo S, et al. Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2003;46:265-71.
59. Rabello A, Luquetti AO, Moreira EF, Gadella MF, Dos Santos JA, De Melo L, et al. Serodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection using the new particle gel immunoassay—ID-PaGIA Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:77-82.
60. Da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends Parasitol*. 2001;17:286-91.
61. Virreira M, Martínez S, Alonso-Vega C, Torrico F, Solano M, Torrico MC, et al. Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75:1082-4.
62. Rodríguez P, Truyens C, Alonso-Vega C, Flores A, Cordova M, Suarez E, et al. Serum levels for IgM and IgA antibodies to anti-*Trypanosoma cruzi* in samples of blood from newborns from mothers with positive serology for Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38 Supl 2:62-4.
63. Garzón E, Genna F, Bosseno MF, Simony-La Fontaine J, Radal M, Sereno D, et al. Differential infectivity and immunopathology in murine experimental infections by two natural clones belonging to the *Trypanosoma cruzi* I lineage. *Parasitology*. 2005;131:109-19.
64. Francolino SS, Antunes AF, Talice R, Rosa R, Selanikio J, De Rezende JM, et al. New evidence of spontaneous cure in human Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36:103-7.