



TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

MOLECULAR TECHNIQUES FOR THE DIAGNOSIS OF CHAGAS DISEASE

ELIZABETH FERRER^{1,2}

Universidad de Carabobo, Sede Aragua, ¹Facultad de Ciencias de la Salud, Departamento de Parasitología,
²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Dr. Francisco J. Triana Alonso" (BIOMED), Maracay, Venezuela
E-mail: elizabeth.ferrer@gmail.com.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y comprende una fase aguda, seguida de una fase crónica, con una parasitemia escasa y una clínica que va desde la ausencia de síntomas hasta una cardiopatía severa. El diagnóstico presenta limitaciones, debido a la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas y la baja especificidad de las inmunológicas. Las técnicas moleculares, especialmente la PCR, que detecta secuencias específicas de ADN del parásito, es una alternativa. Se han descrito varias dianas de amplificación, siendo las más utilizadas, por su alta sensibilidad y especificidad, las PCR que amplifican el ADN satélite y el ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi*. Aunque la técnica de PCR también tiene algunas limitaciones en cuanto a costo, infraestructura necesaria y sensibilidad en fase crónica de la enfermedad, tiene muchas ventajas especialmente en casos agudos, en Chagas congénito, en inmunodeficiencias y resultan adecuadas en la evaluación y seguimiento del tratamiento. Se han desarrollado algunas variantes más avanzadas como PCR a tiempo real, la amplificación isotérmica y la detección de los productos de PCR mediante tiras cromatográficas. Lo más adecuado sería combinar el uso de las técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares de acuerdo a la fase de la enfermedad que se sospecha y las características del paciente. En Venezuela, las técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, solo se utilizan en laboratorios de investigación, sería recomendable su incorporación al grupo de pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas en el país.

PALABRAS CLAVE: *Trypanosoma cruzi*, PCR, ADN.

ABSTRACT

Chagas disease is caused by the parasite *Trypanosoma cruzi* and includes an acute phase followed by a chronic phase, with low parasitemia and clinical manifestations range from no symptoms to severe heart disease. Diagnosis has limitations due to the low sensitivity of the parasitological techniques and the low specificity of immunological ones. Molecular techniques, especially PCR, that detects specific DNA sequences of the parasite, is an alternative. Several targets have been described for amplification, the most used because of its high sensitivity and specificity are the PCR that amplified satellite DNA and minicircle kinetoplast DNA of *T. cruzi*. Although the PCR technique also has some limitations in terms of cost, infrastructure needed and sensitivity in the chronic phase of the disease, has many advantages, especially in acute cases, congenital Chagas, in immunodeficiencies and are appropriate in the evaluation and monitoring of treatment. More advanced variants have been developed, such as; real time PCR, isothermal amplification and detection of PCR products by chromatographic strips. It would be appropriate to combine the use of parasitological, immunological and molecular techniques according to the suspected phase of the disease and patient characteristics. In Venezuela, the molecular techniques for diagnosis of Chagas disease are only used in research laboratories. It would be advisable to incorporate the molecular diagnostic tests to the group of techniques for diagnosis of Chagas disease in the country.

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*, PCR, DNA.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es una parasitosis causada por *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido principalmente por un vector hematófago (triatomino). Se estima que en el continente Americano existen aproximadamente entre 7 y 8 millones de personas infectadas, y 25 millones están en situación de riesgo de contraer la enfermedad (WHO 2012, 2014). La enfermedad de Chagas comprende una fase aguda, que puede ser sintomática o asintomática, caracterizada por una abundante parasitemia, seguida de una recuperación y de la instauración de la fase crónica

de la enfermedad, con una parasitemia escasa y un curso clínico impredecible, que va desde la ausencia de síntomas hasta una enfermedad severa con compromiso cardiovascular y/o gastrointestinal que puede ocasionar la muerte (Prata 2001).

En Venezuela, actualmente existe un repunte de la enfermedad de Chagas. Los recientes focos y brotes agudos por transmisión oral en la región capital, y en los estados Vargas y Táchira (Alarcón de Noya *et al.* 2010, Benítez *et al.* 2013, Segovia *et al.* 2013), así como el reporte de casos agudos en los diferentes estados del

país (Añez *et al.* 1999, 2004, 2007, 2011, Morocoima *et al.* 2008) y el aumento de seropositivos en bancos de sangre (Díaz-Bello *et al.* 2008), indican el resurgimiento de la enfermedad en el país. La migración humana de otras áreas endémicas, llevando reservorios domésticos y vectores infectados con *T. cruzi*, la urbanización desorganizada, la deforestación y la irrupción en ciclos silvestres son elementos de riesgo que explicarían la emergencia y re-emergencia de la enfermedad de Chagas en Venezuela (Díaz-Suárez 2009, Añez *et al.* 2011, Herrera 2014).

DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En general, el diagnóstico de la enfermedad se basa en los signos y síntomas clínicos, los datos epidemiológicos y los resultados de laboratorio, incluyendo pruebas parasitológicas, inmunológicas, y moleculares, cuyo uso y utilidad dependerá de la fase en la que se encuentre la enfermedad.

Diagnóstico clínico-epidemiológico

En principio se realiza un diagnóstico clínico y epidemiológico, en la cual se reúnen un conjunto de datos tales como; procedencia y tipo de vivienda del paciente, referir contacto con triatominos, historia de transfusiones sanguíneas, entre otros, además de realizarse el examen físico para así orientar si el paciente pudiese presentar la enfermedad y en qué fase podría encontrarse (Añez *et al.* 1999). En la fase aguda el diagnóstico clínico puede confundirse con varias infecciones febriles puesto que la sintomatología no sigue un patrón característico. En la fase crónica es más difícil orientar el diagnóstico. La miocarditis, los antecedentes de haber vivido en una región endémica de la enfermedad de Chagas y las alteraciones radiológicas y electrocardiográficas son herramientas fundamentales para orientar al médico hacia el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Botero y Restrepo 2012).

Diagnóstico parasitológico

Los métodos parasitológicos permiten visualizar la presencia de parásitos y su sensibilidad varía dependiendo de la fase en que se encuentre la enfermedad. En la fase aguda se utilizan los métodos parasitológicos tanto directos (examen de sangre al fresco, extendido coloreado y gota gruesa) como indirectos (xenodiagnóstico, hemocultivo e inoculación en animales sensibles) debido a que existe una parasitemia detectable. Los

métodos parasitológicos indirectos tienen como objetivo multiplicar los parásitos en el laboratorio a partir de diferentes muestras del paciente, siendo importantes cuando la detección por métodos directos es poco factible debido a bajas parasitemias, con el inconveniente de que no están disponibles en los laboratorios de rutina. Otros métodos utilizados son los métodos de concentración, los cuales utilizan un mayor volumen de sangre para aumentar la probabilidad de detectar al parásito, entre estas técnicas encontramos análisis de la crema leucocitaria, triple centrifugación, centrifugación con silicón líquido y técnica de Strout. Además, se pueden realizar biopsias, para la observación del parásito en los tejidos, pero son pocos utilizadas en la rutina por ser un método invasivo (Becerril 2011, Botero y Restrepo 2012).

Diagnóstico inmunológico

Para el diagnóstico de la enfermedad en la fase crónica, donde la parasitemia es muy baja o indetectable, se emplean los métodos inmunológicos que consisten principalmente en la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*. Las técnicas más utilizadas en la actualidad son el Ensayo inoenzimático (ELISA) (Voller *et al.* 1975), la Hemaglutinación indirecta (HAI) (Camargo *et al.* 1971) e Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Camargo 1996). Sin embargo, estas técnicas pueden ser poco específicas, ya que pueden dar reacciones cruzadas con otros parásitos, principalmente con los pertenecientes a la familia Trypanosomatidae, por ejemplo *T. rangeli* (no patógeno) y *Leishmania* spp. (Guhl y Vallejo 2003). Debido a esto la Organización Mundial de la Salud recomienda aplicar al menos dos técnicas con la finalidad de tener un alto grado de confiabilidad, sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia entre ellas (OMS 2002).

La aplicación de las técnicas de biología molecular ha permitido la producción de antígenos específicos y en gran cantidad, para su utilización en las técnicas inmunológicas, tales como antígenos recombinantes y péptidos sintéticos. Se han desarrollado técnicas de ELISA, Inmunocromatografía, Inmunoblot y Western blotting basados en el uso de antígenos recombinantes y péptidos sintéticos de *T. cruzi*, que han demostrado la detección de anticuerpos en individuos en fase crónica de la enfermedad, con una alta sensibilidad y especificidad. El empleo de estos kits pudiese ser una herramienta útil en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, sin embargo en algunos países su aplicación se encuentra bajo estudio (Umezawa *et al.* 2004, Foti *et al.* 2009). Por otro lado, se han desarrollado técnicas inmunológicas basadas en péptidos sintéticos específicos de linaje del parásito con

potencial en diagnóstico (Bhattacharyya *et al.* 2014).

En Venezuela, el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas es comúnmente realizado en centros públicos y privados utilizándose principalmente pruebas comerciales por varios laboratorios nacionales y extranjeros. En este respecto, algunos investigadores han informado sobre resultados inconsistentes registrados en pacientes diagnosticados en estos centros, cuando se comparan con los obtenidos en laboratorios especializados en el estudio de la enfermedad de Chagas (Díaz-Bello *et al.* 2008).

Limitaciones en el diagnóstico parasitológico e inmunológico

Tanto los métodos parasitológicos, como los inmunológicos presentan limitaciones para el diagnóstico de la enfermedad. Las pruebas parasitológicas pueden presentar baja sensibilidad principalmente en la fase crónica de la enfermedad donde la parasitemia es escasa. Los ensayos inmunológicos, pueden presentar problemas de baja especificidad debido principalmente a reacciones cruzadas con otros parásitos relacionados, como *Leishmania* spp. y *T. rangeli* (Guhl y Vallejo 2003).

Existen otras limitaciones en cuanto a las pruebas inmunológicas como son: el seguimiento del tratamiento, ya que los anticuerpos se mantienen elevados, aunque la infección haya sido curada (Murcia *et al.* 2010, Aguiar *et al.* 2012), el diagnóstico de Chagas congénito donde no se puede diferenciar si los anticuerpos detectados son provenientes de la madre o el niño (Virreira *et al.* 2003, Díez *et al.* 2008) y el diagnóstico en los casos de pacientes con inmunodeficiencias en los cuales no hay una respuesta marcada de anticuerpos aunque el paciente esté infectado (Bern 2012).

En el caso de trasplantes de órganos, en los cuales los pacientes son inmunosuprimidos, las técnicas inmunológicas pierden efectividad (Qvarnstrom *et al.* 2012). Para el diagnóstico oportuno y rápido en el caso de accidentes de laboratorio, tampoco es conveniente el uso de técnicas inmunológicas, ya que los anticuerpos requieren de 7 a 15 días aproximadamente para su formación. De igual manera, en los casos de brotes de enfermedad de Chagas por transmisión oral, que requieren un tratamiento inmediato, se necesitan de varios días para la formación de anticuerpos detectables por las técnicas inmunológicas (Bern *et al.* 2011).

Por otro lado, la sensibilidad de las pruebas

inmunológicas, en fase aguda temprana pudiese ser menor que en la fase crónica, debido a la insuficiente cantidad de anticuerpos para ser detectados por estas técnicas. Además, se ha reportado que existe un pequeño porcentaje de pacientes con la enfermedad de Chagas que no presentan una respuesta de anticuerpos detectables, son los llamados “no respondedores” (Vásquez *et al.* 1997).

En los casos de detección en reservorios animales, se requiere de conjugados específicos de cada especie y en el caso de vectores no se puede hacer por técnicas inmunológicas y por las parasitológicas, puede pasar desapercibidos la infección si la carga parasitaria es baja (Enriquez *et al.* 2013).

Debido a todas estas limitaciones en las técnicas convencionales de diagnóstico, se hace necesaria la utilización de otras técnicas que permitan solventar estos problemas.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Los métodos de biología molecular se caracterizan por ser específicos y poseer elevada sensibilidad, ya que detectan el ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito, aunque exista una cantidad pequeña de estos en la circulación sanguínea. En un principio se usaron las técnicas de hibridación y actualmente el diagnóstico molecular se basa en la detección de fragmentos específicos de ADN del genoma del parásito mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR por sus siglas en inglés “Polymerase Chain Reaction”. que tiene como finalidad amplificar varias veces un pequeño fragmento de ADN, para obtener múltiples copias resultando muy sensible, ya que detecta poca cantidad de ADN, debido a la amplificación de una secuencia específica del ADN de *T. cruzi* (Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda 2003).

Las pruebas de PCR utilizan iniciadores, cebadores o “primers” para delimitar la amplificación de un segmento determinado del ADN utilizando una ADN polimerasa termoresistente. El resultado de la prueba es la amplificación de un fragmento de ADN específico, de tamaño conocido, detectado a través de la electroforesis en geles de agarosa donde es visualizado como una banda discreta mediante la fluorescencia a la luz UV luego del tratamiento del gel con compuestos fluorescentes intercaladores de ADN seguido por un registro fotográfico (Sambrook y Russell 2001, Herráez 2012).

Se han desarrollado diferentes protocolos de PCR

basadas en la amplificación de diferentes dianas para el diagnóstico de infección con *T. cruzi*, lo cual ha contribuido a la obtención de un despistaje más certero de la enfermedad (Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda 2003, Virreira *et al.* 2003). Experimentalmente las pruebas de PCR han mostrado una alta sensibilidad y especificidad en la detección de la infección por *T. cruzi*. Sin embargo su uso en el diagnóstico clínico requiere la estandarización y validación de los protocolos en cada laboratorio (Ferrer *et al.* 2008, 2009).

Secuencias dianas de la PCR para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Existen diferentes protocolos de PCR basados en distintas dianas de amplificación, aunque se han descrito muchas dianas de PCR utilizadas en diagnóstico, solo unas pocas han resultado con los adecuados índices diagnósticos, las más comunes se resumen en la Tabla 1 y se describen a continuación:

PCR para la amplificación de secuencias repetitivas de ADN satélite (ADNs)

El ADN satélite de *T. cruzi*, es altamente repetitivo y agrupado, se encuentra en unidades de pequeño tamaño y está formado por aproximadamente 120.000 copias de una secuencia repetida en tándem de 195 pares de bases (pb), lo que representa el 10% del ADN del parásito y está ubicado en cualquier región del cromosoma además de las porciones teloméricas y centroméricas (Elías *et al.* 2003, Martins *et al.* 2008). En 1989 Moser *et al.* desarrollaron una PCR basada en la amplificación de 188 pb de este ADN repetitivo de 195 pb, a partir de muestras de sangre de pacientes y ratones infectados con *T. cruzi*. Esta PCR además de ser sensible, resultó muy específica, ya que no amplificó ninguna secuencia de ADN de *Leishmania* spp. ni de otra especie de *Trypanosoma*. Posteriormente, Russomando *et al.* (1992) realizaron estudios en ratones infectados empleando muestras de suero, obteniendo una alta sensibilidad y especificidad en la detección de *T. cruzi*. En ambos casos se compararon los resultados con los métodos parasitológicos, encontrando que esta técnica era sensible y específica en cualquier fase de la enfermedad. Por otro lado Kirchhoff *et al.* (1996) determinaron que la técnica de PCR permite diagnosticar la infección por *T. cruzi* más temprano que los métodos parasitológicos, debido a su elevada sensibilidad. Posteriormente muchos investigadores han utilizado esta diana para diagnóstico (Virreira *et al.*

2003, Piron *et al.* 2007, Duffy *et al.* 2013).

PCR para la amplificación de ADN de minicírculos de kinetoplasto (ADNk) región variable

Permite la detección de ADN de las regiones variables de los minicírculos del kinetoplasto de *T. cruzi*. El parásito presenta generalmente entre 10.000 y 30.000 minicírculos y cada uno de estos presenta cuatro copias de la región variable, lo cual hace que se pueda tener hasta 120.000 copias por parásito de la secuencia a amplificar (Junqueira *et al.* 2005, Telleria *et al.* 2006). Esta diana presenta una elevada sensibilidad, en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Ávila *et al.* 1993, Wincker *et al.* 1994). Numerosos investigadores han utilizado esta técnica (Britto *et al.* 1993, 1995, Junqueira *et al.* 1996, Wincker *et al.* 1997, Virreira *et al.* 2003).

PCR para la amplificación de ADN de la secuencia repetitiva nuclear esparcida 1025

Esta diana fue descrita por Requena *et al.* (1992) está basada en una repetición de 1025 pb esparcida en el genoma del parásito. Está presente en varias cepas de *T. cruzi* y ausente en otros tripanosomátidos y en el ADN humano. Esta secuencia representa cerca del 7% del ADN nuclear, con aproximadamente 10.000 copias por genoma del parásito.

PCR para la amplificación de ADN del espaciador intergénico 1 (ITS1)

Este protocolo de PCR está basado en la amplificación de la secuencia del espaciador intergénico ITS1 (ITS del inglés *Intergenic Transcribed Spacers*) del ADN ribosomal del parásito, donde se pueden encontrar aproximadamente 400 copias. La amplificación de esta secuencia ha sido obtenida mediante PCR utilizando varias cepas de *T. cruzi*, heces de vectores y muestras de suero humano (González *et al.* 1994).

PCR para la amplificación de ADN de la secuencia repetitiva del clon 6

Se basa en la amplificación en una secuencia denominada clon 6, una secuencia moderadamente repetitiva dispersa en el genoma de *T. cruzi* que fue clonada por Araya *et al.* en 1997. Se estima que existen aproximadamente 1.000 copias de esta secuencia por genoma del parásito.

PCR para la amplificación de ADN de la secuencia de la región subtelomérica.

Esta PCR se basa en la amplificación de una región de la secuencia subtelomérica del genoma del parásito, descrita por Chiurillo *et al.* en el año 2003. Permite la detección de *T. cruzi* y *T. rangeli* en una PCR dúplex. Se ha utilizado esta técnica en muestras de triatomíneos infectados experimental y naturalmente y de humanos infectados, demostrando ser sensible, específica y que detecta todas las cepas y linajes del parásito.

PCR para la amplificación de ADN de la secuencia codificante de la proteína flagelar Tc24

Este protocolo de PCR está basado en la amplificación de la secuencia 3' terminal del gen codificante de la proteína flagelar Tc24, una proteína recombinante sensible para el inmunodiagnóstico, pero con reacción cruzada con *T. rangeli*. Sin embargo, la secuencia de ADN mencionada ha demostrado ser una secuencia específica para la detección de ADN de *T. cruzi* (Taibi *et al.* 1995).

Se han realizados diversos estudios tanto por grupos de investigación de cada país (Virreira *et al.* 2003, Portela-Lindoso y Shikanai-Yasuda 2003, Duarte *et al.* 2014), como estudios internacionales multicéntricos auspiciados y avalados por la OPS y OMS (Schijman *et al.* 2011) con la finalidad de evaluar las pruebas moleculares utilizadas en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

La mayoría de estos estudios han dado como resultado que las mejores dianas a emplear en la técnica de PCR para diagnóstico de la enfermedad de Chagas son la PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (Moser *et al.* 1989) y la PCR para la detección de ADN de las regiones variables de los mini-círculos del kinetoplasto de *T. cruzi* (Ávila *et al.* 1993, Wincker *et al.* 1994). Ambas técnicas se han aplicado en muestras de pacientes, reservorios y vectores y han sido estandarizadas y validadas en muchos laboratorios (Ferrer *et al.* 2008, 2009).

Generalmente, estas dos PCR muestran buena concordancia, sin embargo, se ha reportado diferencias significativas entre los resultados de las mismas (Ferrer *et al.* 2009). Estas diferencias en sensibilidad podrían deberse a la variabilidad genética de los diferentes aislados parasitarios, ya que el número de copias de las repeticiones de las secuencias que se amplifican en las PCR varían dependiendo del aislado parasitario, lo que

genera variaciones en la sensibilidad de los ensayos (Elías *et al.* 2003, Telleria *et al.* 2006, Ferrer *et al.* 2013), por lo que se recomienda la combinación de las dos técnicas de PCR para incrementar la veracidad del diagnóstico (Ferrer *et al.* 2009, Qvarnstrom *et al.* 2012).

Limitaciones de la Técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Una de las mayores limitaciones de la técnica de PCR en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas es su baja sensibilidad en la fase crónica debido a la escasez de parásitos circulantes, ya que estos están confinados a tejidos (Ávila *et al.* 1993, Wincker *et al.* 1997). Sin embargo, es importante resaltar que en la sensibilidad de la PCR influye también el método de extracción de ADN y el volumen de sangre que se emplea para la extracción de ADN (Schijman *et al.* 2011, Ferrer *et al.* 2013). El costo, la necesidad de equipos e infraestructura especializada (Thekisoe *et al.* 2010) y la necesidad de estandarización y evaluación de las diferentes técnicas de PCR (Ferrer *et al.* 2009, 2013) también son limitaciones para la implementación de las técnicas moleculares en el diagnóstico de rutina de la enfermedad de Chagas.

AVANCES EN EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Debido al potencial de la técnica de PCR para el diagnóstico, a sus ventajas en algunos casos y a sus posibles desventajas, se han desarrollado algunos avances, como se describe a continuación:

PCR a tiempo real (*Real Time PCR*)

La PCR cuantitativa (del inglés, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*; qPCR o Q-PCR) o PCR a tiempo real (del inglés *Real Time PCR*) es una variante de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta el producto de la amplificación del ADN. Para ello emplea, del mismo modo que la PCR convencional, un molde de ADN, cebadores específicos, dNTPs, tampón de reacción y una ADN polimerasa termoestable. Se le añade una sonda marcada con un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia, tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación y es por esto que también se le denomina PCR a tiempo real, mientras que en la PCR convencional los resultados de ven a

tiempo final (Herráez 2012).

La primera PCR a tiempo real para *T. cruzi* se utilizó para la cuantificación de ADN en tejido de animales infectados (Cummings y Tarleton 2003). Se han empleado como dianas de amplificación las mismas empleadas en las PCR convencionales, como son; ADN satélite y las regiones variables de los mini-círculos del kinetoplasto de *T. cruzi*, que han resultado más sensibles en este formato.

La primera PCR a tiempo real para diagnóstico en humanos fue usada para la identificación de linajes de *T. cruzi* en muestras de tejido de pacientes infectados en fase crónica de la enfermedad (Freitas *et al.* 2005). Posteriormente, Virreira *et al.* (2006) desarrollaron una técnica de PCR a tiempo real para la detección de ADN de kinetoplasto de *T. cruzi* en líquido amniótico de pacientes embarazadas, sin embargo, esta muestra no fue adecuada para el diagnóstico de Chagas congénito. En otro trabajo del mismo grupo se empleó la PCR a tiempo real para la detección de ADN de kinetoplasto de *T. cruzi* en muestras de sangre de madres y recién nacidos para cuantificación de ADN y determinación de linajes del parásito, encontrándose discrepancias en los resultados (Virreira *et al.* 2007).

En el año 2007 Piron *et al.* desarrollaron un protocolo de PCR a tiempo real basado en la amplificación de ADN satélite en muestras de sangre de pacientes chagásicos, la cual resultó altamente sensible y específica. Posteriormente estos protocolos de PCR a tiempo real han sido utilizados para diagnóstico de pacientes crónicos, de Chagas congénito, en casos de inmunosuprimidos y para seguimiento de tratamiento (Duffy *et al.* 2009, 2013, De Freitas *et al.* 2011, Qvarnstrom *et al.* 2012, Apt *et al.* 2013, Moreira *et al.* 2013). Este tipo de PCR tiene como ventaja ser más sensible y que evita el uso de geles teñidos con sustancias contaminantes y como desventaja ser más costosa y requerir equipos e infraestructura más complejos y onerosos.

Amplificación isotérmica LAMP (*Loop Mediated Isothermal Amplification*)

LAMP es una técnica de amplificación de ácidos nucleicos isotérmica. En contraste con la PCR, en la que se lleva a cabo la reacción en una serie de pasos alternados de diferentes temperaturas, la amplificación isotérmica se realiza a una temperatura constante de 60-65°C y no requiere un termociclador. En la LAMP, se usan dos o tres conjuntos de cebadores y una polimerasa con una alta

actividad de desplazamiento de cadena, además de una actividad de replicación. Típicamente, cuatro cebadores diferentes se utilizan para identificar seis regiones distintas en el gen diana, que añade especificidad. Un par adicional de "cebadores bucle" puede acelerar aún más la reacción. Debido a la naturaleza específica de la acción de estos cebadores, la cantidad de ADN producido en la LAMP es considerablemente más alta que la PCR convencional (Thekisoe *et al.* 2007).

La detección de producto de amplificación se puede determinar a través de fotometría de la turbidez causada por una cantidad cada vez mayor de precipitado de pirofosfato de magnesio en solución como un subproducto de la amplificación. Esto permite una fácil visualización a simple vista. La reacción se puede seguir en tiempo real, ya sea mediante la medición de la turbidez o por fluorescencia usando colorantes intercalantes tales como SYBR Green que se puede ver a simple vista sin la necesidad de equipos costosos ya que se intercalan directamente en el ADN, y pueden ser correlacionados con el número de copias presentes inicialmente, por lo tanto, también puede ser cuantitativa (Thekisoe *et al.* 2010).

La técnica LAMP fue usada por primera vez para detección de ADN de *T. cruzi* en el 2007 por Thekisoe *et al.* logrando detectar hasta un femtogramo de ADN y demostrando ser una técnica rápida y simple, de utilidad en laboratorios de pocos recursos. Posteriormente ha sido usada para la detección de ADN ribosomal 18S de *T. cruzi* en contenido intestinal de vectores, logrando una sensibilidad de 100 femtogramos (Thekisoe *et al.* 2010).

Revelado de productos de PCR mediante tiras cromatográficas (*T. cruzi* OligoC-test)

Uno de los inconvenientes de la técnica de PCR es que generalmente el revelado de los productos de amplificación se basa en la electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, la cual es una sustancia de riesgo cancerígeno y contaminante. Debido a esta limitación se han desarrollado técnicas comerciales en formato tira reactiva o "dipstick", que emplean el uso de tiras cromatográficas para el revelado de los productos de PCR. Estos formatos comerciales proporcionan una elevada sensibilidad y especificidad en la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (Deborggraeve *et al.* 2009).

Recientemente se ha desarrollado otro formato cromatográfico basado en la detección de ADN de kinetoplasto de *T. cruzi*, ya que se habían observado

diferencias en cuanto al linaje del parásito con respecto a la detección de ADN satélite. En un estudio comparativo con los dos formatos *T. cruzi* OligoC-test (ADN satélite y ADN de kinetoplasto) se encontró una sensibilidad ligeramente más alta en el *T. cruzi* OligoC-test que detecta ADN de kinetoplasto (De Winne *et al.* 2014). Las ventajas de estas técnicas son la rapidez en la detección de forma segura, evitando el uso de sustancias contaminantes, la desventaja podría ser el incremento de los costos de la técnica de PCR.

UTILIDAD DE LA TÉCNICA DE PCR EN DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Como se ha descrito anteriormente, existe una serie de circunstancias en las cuales el diagnóstico molecular es una alternativa muy importante, en infecciones que cursan con bajas parasitemias (Ferrer *et al.* 2013), en Chagas congénito, en recién nacidos, donde las pruebas de PCR han demostrado alta sensibilidad (Bisio *et al.* 2011, Qvarnstrom *et al.* 2012, Sesti-Costa *et al.* 2012, Apt *et al.* 2013, Velázquez *et al.* 2014) en inmunodeficiencias o en pacientes inmunocomprometidos, en los cuales, la producción de anticuerpos es deficiente (De Freitas *et*

al. 2011, Bern 2012). También, en el seguimiento a los pacientes en tratamiento (Aguar *et al.* 2012, Machado-de Assis *et al.* 2012, Moreira *et al.* 2013, Blanchet *et al.* 2014) donde los métodos inmunológicos no son adecuados, ya que la respuesta de anticuerpos se mantiene por mucho tiempo. Además, la PCR es muy importante en individuos no respondedores o con niveles bajos de anticuerpos, en accidentes de laboratorio, en trasplantes de órganos (Benvenuti *et al.* 2011, Bern 2012), en brotes de Chagas por transmisión oral (Bern *et al.* 2011) y para diferenciar infección por *T. cruzi* de infección por *T. rangeli* (Guhl y Vallejo 2003).

Todos los trabajos publicados señalan la utilidad de los métodos moleculares en la fase aguda de la enfermedad y en los casos descritos y de los métodos inmunológicos en la fase crónica de la enfermedad, aunque lo más recomendable, a fin de garantizar un diagnóstico certero, es combinar el uso de las técnicas parasitológicas, inmunológicas y moleculares de acuerdo a la fase de la enfermedad que se sospecha y las características del paciente (Ferrer *et al.* 2013). La discrepancia entre los resultados obtenidos en los diferentes centros de diagnóstico y los de los laboratorios especializados en el estudio de la enfermedad de Chagas en Venezuela, señalan

Tabla 1. Protocolos de PCR empleados en diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Nº	Diana	Cebadores	Secuencia cebadores	Productos	Referencias
1	ADN satélite 195pb	TCZ1 TCZ2	5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' 5'-CCTCCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'	188 pb*	Moser <i>et al.</i> 1989
2	ADNk kinetoplasto región variable	121 122	5'-AAATAATGTACGGGTGAGATGCATGA-3' 5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	330 pb	Britto <i>et al.</i> 1993, 1995
3	ADNk kinetoplasto región variable	S35' S36'	5'-ATAATGTACGGGTGAGATGCATG-3' 5'-GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT-3'	330 pb	Ávila <i>et al.</i> 1993
4	Secuencia repetitiva nuclear esparcida 1025	O1 O2	5'-TGGCTTGGAGGAGTTATTGTGC-3' 5'-AGGAGTGACGGTTGATCAGT-3'	250 pb	Requena <i>et al.</i> 1992
5	Espaciador intergénico (ITS1)	F1 F2	5'-GGGAGAGGTTCCAGATGT-3' 5'-GTCGGAGCAGGGACAGC-3'	130 pb	González <i>et al.</i> 1994
6	Repetición Clon 6	Clon 6 F Clon 6 R	5'-GATGCGCATTTGTTACGA-3' 5'-CTGGCTGGCCTTGTATCC-3'	320 pb	Araya <i>et al.</i> 1997
7	Región subtelomérica	Tc189Fw2 Tc189Rv3	5'-CCAACGCTCCGGGAAAAC-3' 5'-GCGTCTTCTCAGTATGGACTT-3'	100 pb	Chiurillo <i>et al.</i> 2003
8	Gen Proteína flagelar	Tc24 F Tc24 R	5'-GACGGCAAGAACGCCAAGGAC-3' 5'-TCACGCGCTCTCCGGCACGTTGTC-3'	250 pb	Taibi <i>et al.</i> 1995

*pb: pares de bases

la necesidad del análisis y comparación de la eficacia de las diferentes técnicas empleadas en diagnóstico (Díaz-Bello *et al.* 2008, Ferrer *et al.* 2013).

En Venezuela, las técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas solo se utilizan en laboratorios de investigación, y en líneas generales, no se conoce la eficacia diagnóstica de las mismas, ya que no se ha realizado una valoración exhaustiva. Recientemente, se ha iniciado un ensayo multicéntrico evaluando diferentes procedimientos para el procesamiento de muestras de sangre y siete pruebas de PCR para la detección de *T. cruzi* en un proyecto en red de Misión Ciencia (FONACIT-MPPCTH proyecto G-2007001442). Los resultados de esta iniciativa podría permitir a mediano plazo la incorporación de las pruebas de PCR al conjunto de pruebas diagnósticas de la enfermedad de Chagas en el país.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR C, BATISTA AM, PAVAN TB, ALMEIDA EA, GUARIENTO ME, WANDERLEY JS, COSTA SC. 2012. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood cultura in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benzonidazole. *Trop. Med. Int. Health.* 17(3):368-373.
- ALARCÓN DE NOYA B., DÍAZ-BELLO Z, COLMENARES C, RUIZ-GUEVARA R., MAURIELLO L, ZAVALA-JASPE R., SUAREZ JA, ABATE T., NARANJO L. PAIVA M., RIVAS L., CASTRO J., MÁRQUES J, MENDOZA I, ACQUATELLA H, TORRES J, NOYA O. 2010. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J. Infect. Dis.* 201(9): 1308-1315.
- AÑEZ N, CARRASCO H, PARADA H, CRISANTE G, ROJAS A., GONZÁLEZ N, RAMÍREZ JL, GUEVARA P, RIVERO C, BORGES R, SCORZA JV. 1999. Acute Chaga's disease in Western Venezuela, a clinical, ecoparasitological and epidemiological study. *Am. J. Trop. Hyg.* 60(2):215-222.
- AÑEZ N, CRISANTE G, ROJAS A. 2004. Update on Chagas disease in Venezuela -a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 99(8):781-787.
- AÑEZ N, CRISANTE G, PARADA H. 2007. Nuevos casos de enfermedad de Chagas en el Occidente de Venezuela. *Salus.* 11(S1):87-90.
- AÑEZ N, ATENCIO R, RIVERO Z, BRACHO A, ROJAS A, ROMERO M, CRISANTE G. 2011. Detección de infecciones inaparentes de la enfermedad de Chagas en individuos asintomáticos de la etnia Yukpa del occidente de Venezuela. *Bol. Mal. Salud Amb.* 51(2):59-67.
- APT W, ZULANTAY I, ARNELLO M, ODDÓ D, GONZÁLEZ S, RODRÍGUEZ J, KEMMERLING U, TRUYENS C, CARLIER Y. 2013. Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: a multidisciplinary study. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107(2):98-104.
- ARAYA J, CANO MI, GOMES HB, NOVAK EM, REQUENA JM, ALONSO C, LEVIN MJ, GUEVARA P, RAMIREZ JL, DA SILVEIRA JF. 1997. Characterization of an interspersed repetitive DNA element in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology.* 115(6):563-570.
- ÁVILA H, PEREIRA J, THIEMMAN O, DE PAIVA E, DEGRAVE W, MOREL C, SIMPSON L. 1993. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polimerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 31(9):2421-2426.
- BECERRIL M. 2011. *Parasitología Médica.* (Tercera edición). Mc Graw Hill Interamericana Editores, México DF, México, pp. 81-93.
- BENÍTEZ JA, ARAUJO B, CONTRERAS K, RIVAS M, RAMÍREZ P, GUERRA W, CALDERON N, ASCASO TERREN C, BARRERA R, RODRIGUEZ-MORALES AJ. 2013. Urban outbreak of acute orally acquired Chagas disease in Táchira, Venezuela. *J. Infect. Dev. Ctries.* 7(8):638-641.
- BENVENUTI LA, ROGGÉRIO A, COELHO G, FIORELLI AI. 2011. Usefulness of qualitative polymerase chain reaction for *Trypanosoma cruzi* DNA in endomyocardial biopsy specimens of chagasic heart transplant patients. *J. Heart Lung Transplant.* 30(7):799-804.
- BERN C. 2012. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25(4):450-457.
- BERN C, MARTIN DL, GILMAN RH. 2011. Acute and congenital Chagas disease. *Adv. Parasitol.* 75:19-

47.

- BHATTACHARYYA T, FALCONAR AK, LUQUETTI AO, COSTALES JA, GRIJALVA MJ, LEWIS MD, MESSENGER LA, TRAN TT, RAMIREZ JD, GUHL F, CARRASCO HJ, DIOSQUE P, GARCIA L, LITVINOV SV, MILES MA. 2014. Development of peptide-based lineage-specific serology for chronic Chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. PLoS Negl. Trop. Dis. 8(5):e2892. doi:10.1371/journal.pntd.0002892.
- BISIO M, SEIDENSTEIN ME, BURGOS JM, BALLERING G, RISSO M, PONTORIERO R, MOREAU M, ALTCHÉH J, LEGUIZAMÓN MS, FREILIJ H, MARCEILLAC M, SCHIJMAN AG. 2011. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 105(10):543-549.
- BLANCHET D, BRENIÈRE SF, SCHIJMAN AG, BISIO M, SIMON S, VÉRON V, MAYENCE C, DEMAR-PIERRE M, DJOSSOU F, AZNAR C. 2014. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. Infect. Genet. Evol. 245-250.
- BOTERO D, RESTREPO M. 2012. Parasitosis Humana (Quinta edición), Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia, pp. 275-304.
- BRITTO C, CARDOSO MA, WINCKER P, MOREL CM. 1993. A simple protocol for the physical cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 88(1):171-172.
- BRITTO C, CARDOSO MA, MONTEIRO V. 1995. Polymerase Chain Reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology. 110(3):241-247.
- CAMARGO M. 1966. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 8(5):227-234.
- CAMARGO M, HOSHINO S, CORREA N, PERES B. 1971. Hemagglutination test for Chagas' disease with chromium chloride formalin-treated erythrocytes, sensitized with *Trypanosoma cruzi* extract. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 13(1):45-50.
- CHIURILLO MA, CRISANTE G, ROJAS A, PERALTA A, DIAS M, GUEVARA P, AÑEZ N, RAMÍREZ JL. 2003. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* infection by duplex PCR assay based on telomeric sequences. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10(5):775-779.
- CUMMINGS KL, TARLETON RL. 2003. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol. Biochem. Parasitol. 129(1):53-59.
- DEBORGGRÆVE S, CORONADO X, SOLARI A, ZULANTAY I, APT W, MERTENS P, LAURENT T, LECLIPTEUX T, STESSENS T, DUJARDIN JC, HERDEWIJN P, BÜSCHER P. 2009. *T. cruzi* Oligo C-TesT: a simplified and standardized polymerase chain reaction format for diagnosis of Chagas disease. PLoS. Negl. Trop. Dis. 3(6):e450. doi: 10.1371/journal.pntd.0000450.
- DE FREITAS VL, DA SILVA SC, SARTORI AM, BEZERRA RC, WESTPHALEN EV, MOLINA TD, TEIXEIRA AR, IBRAHIM KY, SHIKANAI-YASUDA MA. 2011. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. PLoS Negl. Trop. Dis. 5(8):e1277. doi: 10.1371/journal.pntd.0001277.
- DE WINNE K, BÜSCHER P, LUQUETTI AO, TAVARES SB, OLIVEIRA RA, SOLARI A, ZULANTAY I, APT W, DIOSQUE P, MONJE-RUMI M, GIRONÈS N, FRESNO M, LOPEZ-VELEZ R, PEREZ-MOLINA JA, MONGE-MAILLO B, GARCIA L, DEBORGGRÆVE S. 2014. The *Trypanosoma cruzi* satellite DNA OligoC-TesT and *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA OligoC-TesT for diagnosis of Chagas disease: a multi-cohort comparative evaluation study. PLoS Negl. Trop. Dis. 8(1):e2633. doi: 10.1371/journal.pntd.0002633.
- DÍAZ-BELLO Z, ZAVALA-JASPE R, DÍAZ-VILLALOBOS M, MAURIELLO L, MAEKELT A, ALARCÓN DE NOYA B. 2008. Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos por bancos de sangre en Venezuela. Invest. Clin. 49(2):141-150.

- DÍAZ-SUÁREZ O. 2009. Chagas disease: re-emergent or neglected. *Invest. Clin.* 50(4):415-418.
- DIEZ CN, MANATTINI S, ZANUTTINI JC, BOTTASSO O, MARCIPAR I. 2008. The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78(4):624-627.
- DUARTE LF, FLÓREZ O, RINCÓN G, GONZÁLEZ CI. 2014. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colomb. Med.* 45(2):61-66.
- DUFFY T, BISIO M, ALTCHER J, BURGOS JM, DIEZ M, LEVIN MJ, FAVALORO RR, FREILIJ H, SCHIJMAN AG. 2009. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3(4):e419. doi: 10.1371/journal.pntd.0000419.
- DUFFY T, CURA CI, RAMIREZ JC, ABATE T, CAYO NM, PARRADO R, BELLO ZD, VELAZQUEZ E, MUÑOZ-CALDERON A, JUIZ NA, BASILE J, GARCIA L, RIARTE A, NASSER JR, OCAMPO SB, YADON ZE, TORRICO F, ALARCON DE NOYA B, RIBEIRO I, SCHIJMAN AG. 2013. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 7(1):e2000. doi: 10.1371/journal.pntd.0002000.
- ELÍAS C, VARGAS N, ZINGALES B, SCHENKMAN S. 2003. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 129(1):1-9.
- ENRIQUEZ GF, CARDINAL MV, OROZCO MM, SCHIJMAN AG, GÜRTLER RE. 2013. Detection of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Trop.* 126(3):211-217.
- FERRER E, DA CONCEIÇÃO F, CAMPIOLI P, RIVERA MG, LÓPEZ M, LARES M, MEDINA M, MOROCOIMA A, HERRERA L. 2008. Estandarización de técnicas moleculares para la identificación y caracterización de *Trypanosoma cruzi*. *Memorias VI Congreso de Investigación en la Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela*, pp. 532-536.
- FERRER E, DA CONCEIÇÃO F, CAMPIOLI P, LARES M, LÓPEZ M, RIVERA MG, VIETTRI M, MEDINA M, SALCEDO M, MOROCOIMA A, HERRERA L. 2009. Validación de protocolos de PCR para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas. *Salus.* 12(S1):163-174.
- FERRER E, LARES M, VIETTRI M, MEDINA M. 2013. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31(5):277-282.
- FOTI L, FONSECA BDE, NASCIMENTO LD, MARQUES CDE, DA SILVA ED, DUARTE CA, PROBST CM, GOLDENBERG S, PINTO AG, KRIEGER MA. 2009. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 104(S1):136-141.
- FREITAS JM, LAGES-SILVA E, CREMA E, PENA SD, MACEDO AM. 2005. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int. J. Parasitol.* 35(4):411-417.
- GONZÁLEZ N, GALINDO I, GUEVARA P, NOVAK E, SCORZA JV, AÑEZ N, DA SILVEIRA JF, RAMÍREZ JL. 1994. Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J. Clin. Microbiol.* 32(1):153-158.
- GUHL R, VALLEJO GA. 2003. *Trypanosoma* (Herpetosoma) rangeli Tejera, 1920- An Updated Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(4):435-442.
- HERRÁEZ A. 2012. Clonación celular: Reacción en Cadena de la Polimerasa. En: *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier España S.L., Madrid, España, pp. 201-209.
- HERRERA L. 2014 *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease: boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. *Front. Public Health.* 2:259. doi: 10.3389/fpubh.2014.00259.
- JUNQUEIRA A, CHIARI E, WINCKER P. 1996. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-

- eastern Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 90(2):129-132.
- JUNQUEIRA A, DEGRAVE W, BRANDÃO A. 2005. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. Trends Parasitol. 21(6):270-272.
- KIRCHHOFF L, VOTAVA J, OCHS D, MOSER D. 1996. Comparison of PCR and Microscope Methods for Detecting *Trypanosoma cruzi*. J. Clin. Microbiol. 34(5):1171- 1175.
- MACHADO-DE ASSIS GF, SILVA AR, DO BEM VA, BAHIA MT, MARTINS-FILHO OA, DIAS JC, ALBAJAR-VIÑAS P, TORRES RM, LANA M. 2012. Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. Clin. Vaccine Immunol. 19(8):1283-1291.
- MARTINS C, SILVA BATISTA C, IENNE S, CERQUEIRA G, BARTHOLOMEU D, ZINGALES B. 2008. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 160(1):60-64.
- MOREIRA OC, RAMÍREZ JD, VELÁZQUEZ E, MELO MF, LIMA-FERREIRA C, GUHL F, SOSA-ESTANI S, MARIN-NETO JA, MORILLO CA, BRITTO C. 2013. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. Acta Trop. 125(1):23-31.
- MOROCHOIMA A, TINEO BRITO EJ, FERRER E, HERRERA L, NUÑEZ M. 2008. Enfermedad de Chagas en el estado Anzoátegui, Venezuela: Registro de un caso agudo y caracterización parasitológica y molecular del aislado. Bol. Malar. Salud Amb. 48(2):147-152.
- MOSER D, KIRCHHOFF L, DONELSON J. 1989. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol. 27(7):1477-1482.
- MURCIA L, CARRILERO B, MUÑOZ MJ, IBORRA MA, SEGOVIA M. 2010. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. J. Antimicrob. Chemother. 65(8):1759-1764.
- OMS (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD). 2002. Control de la enfermedad de Chagas. Segundo Informe del Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 905. Ginebra.
- PRATA A. 2001. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect. Dis. 1:92-100.
- PIRON M, FISA R, CASAMITJANA N, LÓPEZ-CHEJADE P, PUIG L, VERGÉS M, GASCÓN J, GÓMEZ I, PRAT J, PORTÚS M, SAULEDA S. 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Trop. 103(3):195-200.
- PORTELA-LINDOSO AA, SHIKANAI-YASUDA MA. 2003. Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction. Rev. Saúde Pública. 37(1):107-115.
- QVARNSTROM Y, SCHIJMAN AG, VERON V, AZNAR C, STEURER F, DA SILVA AJ. 2012. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. PLoS Negl. Trop. Dis. 6(7):e1689. doi: 10.1371/journal.pntd.0001689.
- REQUENA JM, JIMENEZ-RUIZ A, SOTO M, LOPEZ MC, ALONSO C. 1992. Characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of *Trypanosoma cruzi*: its potential use in diagnosis and strain classification. Mol. Biochem. Parasitol. 51(2):271-280.
- RUSSOMANDO G, FIGUEROA A, ALMIRON M, SAKAMOTO M, MORITA K. 1992. Polymerase Chain reaction-Based Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J. Clin. Microbiol. 30(11):2864-2868.
- SAMBROOK J, RUSSEL D. 2001. Molecular Cloning: a laboratory manual, 3a (Ed). Cold Spring Harbor, New York, USA, pp. 8.4-8.24.
- SCHIJMAN AG, BISIO M, ORELLANA L, SUED M, DUFFY T, MEJIA JARAMILLO AM, CURA C, AUTER F, VERON V, QVARNSTROM Y, EBORGGRAEVE S, HIJAR G, ZULANTAY I, LUCERO RH, VELAZQUEZ E, TELLEZ T, SANCHEZ LEON Z, GALVÃO L, NOLDER D, MONJE RUMI M, LEVI JE, RAMIREZ JD, ZORRILLA P, FLORES

- M, JERICIC MI, CRISANTE G, AÑEZ N, DE CASTRO AM, GONZALEZ CI, ACOSTA VIANA K, YACHELINI P, TORRICO F, ROBELLO C, DIOSQUE P, TRIANA CHAVEZ O, AZNAR C, RUSSOMANDO G, BÜSCHER P, ASSAL A, GUHL F, SOSA ESTANI S, DA SILVA A, BRITTO C, LUQUETTI A, LADZINS J. 2011. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. PLoS Negl. Trop. Dis. 5(1): e931. doi: 10.1371/journal.pntd.0000931.
- SEGOVIA M, CARRASCO HJ, MARTÍNEZ CE, MESSENGER LA, NESSI A, LONDOÑO JC, ESPINOSA R, MARTÍNEZ C, ALFREDO M, BONFANTE-CABARCAS R, LEWIS MD, ALARCON DE NOYA B, MILES MA, LLEWELLYN MS. 2013. Molecular epidemiologic source tracking of orally transmitted Chagas disease, Venezuela. Emerg. Infect. Dis. 19(7):1098-1101.
- SESTI-COSTA R, SILVA JS, GUTIERREZ FR. 2012. Congenital Chagas disease: time to screen pregnant women? Expert. Rev. Anti Infect. Ther. 10(11):1279-1282.
- TAIBI A, GUEVARA-ESPINOZA A, SCHÖNECK R, YAHIAOUI B, OUAISSI A. 1995. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. Parasitology. 111(5):581-590.
- TELLERIA J, LAFAY B, VIRREIRA M, BARNABÉ C, TIBAYRENC M, SVOBODA M. 2006. *Trypanosoma cruzi*: Sequence analysis of the variable region of kinetoplast minicircles. Exp. Parasitol. 114(4): 279-288.
- THEKISOE OM, KUBOKI N, NAMBOTA A, FUJISAKI K, SUGIMOTO C, IGARASHI I, YASUDA J, INOUE N. 2007. Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomosis. Acta Trop. 102(3):182-189.
- THEKISOE OM, RODRIGUEZ CV, RIVAS F, CORONEL-SERVIAN AM, FUKUMOTO S, SUGIMOTO C, KAWAZU S, INOUE N. 2010. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Am. J. Trop. Med. Hyg. 82(5):855-860.
- UMEZAWA ES, LUQUETTI AO, LEVITUS G, PONCE C, PONCE E, HENRIQUEZ D, REVOLLO S, ESPINOZA B, SOUSA O, KHAN B, DA SILVEIRA JF. 2004. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas' disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: results of a collaborative study in six Latin American countries. J. Clin. Microbiol. 42(1):449-452.
- VÁSQUEZ JE, KRUSNELL J, ORN A, SOUSA OE, HARRIS RA. 1997. Serological diagnosis of *Trypanosoma rangeli* infected patients. A comparison of different methods and its implications for the diagnosis of Chagas' disease. Scand. J. Immunol. 45(3):322-330.
- VELÁZQUEZ EB, RIVERO R, DE RISSIO AM, MALAGRINO N, ESTEVA MI, RIARTE AR, RUIZ AM. 2014. Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Trop. 137:195-200.
- VIRREIRA M, TORRICO F, TRUYENS C, ONSO-VEGA C, SOLANO M, CARLIER Y, SVOBODA M. 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 68(5):574-582.
- VIRREIRA M, MARTINEZ S, ALONSO-VEGA C, TORRICO F, SOLANO M, TORRICO MC, PARRADO R, TRUYENS C, CARLIER Y, SVOBODA M. 2006. Amniotic fluid is not useful for diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am. J. Trop. Med. Hyg. 75(6):1082-1084.
- VIRREIRA M, TRUYENS C, ALONSO-VEGA C, BRUTUS L, JUENA J, TORRICO F, CARLIER Y, SVOBODA M. 2007. Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. Am. J. Trop. Med. Hyg. 77(1):102-106.
- VOLLER A, BIDWELL D, HULDT G, ENGVALL A. 1975. Microplate enzyme-linked immunosorbed assay for Chagas disease. Lancet. 1(7904):426-428.
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2012. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. WHO Technical Report Series 975. Disponible en línea en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/77472/1/WHO_TRS_975_eng.pdf?ua=1 (Acceso 08.01.2015).
- WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). 2014. Chagas

Disease (American Trypanosomiasis). Fact Sheet N° 340. Disponible en línea en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>. (Acceso 08.01.2015).

- WINCKER P, BOSSENO MF, BRITTO C, YAKSIC N, CARDOSO MA, MOREL CM, BRENIERE SF. 1994. High correlation between Chagas disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in bolivian children living in an endemic area. FEMS Microbiol. 124(3):419-424.
- WINCKER P, TELLERIA J, BOSSENO MF, CARDOSO MA, MARQUES P, YAKSIC N, AZNAR C, LIEGEARD P, HONTEBEYRIE M, NOIREAU F, MOREL CM, BRENIERE SF. 1997. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. Parasitology. 114(4):367-373.