

¿CÓMO SE DIAGNOSTICA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS?

Palabras clave: Diagnóstico, Métodos parasitológicos, Métodos serológicos, Métodos moleculares.

Key words: : *Diagnosis, Parasitological methods, Serological methods, Molecular methods.*

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad potencialmente mortal causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se estima que en el mundo hay más de 6 millones de personas infectadas. Esta enfermedad está presente en áreas endémicas de 21 países del continente americano, abarcando desde el sur de los Estados Unidos hasta Chile y Argentina y es, además, una preocupación global emergente en áreas no endémicas debido a las migraciones de personas infectadas. Al ser una enfermedad desatendida, la gran mayoría de los pacientes con enfermedad de Chagas tiene un acceso limitado a un diagnóstico y tratamiento adecuados, especialmente en las regiones endémicas donde los laboratorios de diagnóstico son escasos y están mal equipados. Las diferentes fases de la enfermedad y los diferentes modos de transmisión determinan qué estrategias diagnósticas o pruebas se deben utilizar. Sin embargo, no hay un consenso sobre los algoritmos de diagnóstico para varios escenarios clínicos de la infección por *T. cruzi*, lo que dificulta el establecimiento de pautas gubernamentales en países endémicos y no endémicos.

■ **Silvia A. Longhi*, Alejandro G. Schijman**

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh)
Instituto de Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor Torres"
INGEBI-CONICET

*E-mail: longhi@dna.uba.ar

Chagas disease or American trypanosomiasis is a life-threatening disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). It is estimated that there are more than 6 million infected people in the world. This disease is present in endemic areas of 21 countries of the American continent, ranging from the southern United States to Chile and Argentina, and is also an emerging global concern in non-endemic areas due to the migration of infected people. Being a neglected disease, most patients with Chagas disease have limited access to proper diagnosis and treatment, especially in endemic regions where diagnostic laboratories are few and poorly equipped. The different phases of the disease and the different modes of transmission determine which diagnostic strategies or tests should be used. However, there is no consensus on diagnostic algorithms for various clinical scenarios of *T. cruzi* infection, making it difficult to establish government guidelines in endemic and non-endemic countries.

■ INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Se transmite principalmente por triatominos que reciben diferentes nombres en diferentes lugares de América: "vinchucas", "chinchas", "chirimachas", "pitos", "barbeiro", "kissing bugs", etc (OMS, 2015). Otros modos de transmisión son: transfusiones de sangre de donantes infectados con *T. cruzi* (OMS, 2014; Angheben et al, 2015); transplacentaria o vertical, que se encuentra en 2% a 11% de los recién nacidos de madres infectadas (Carlier et al, 2019); a través del consumo de alimentos contaminados con *T. cruzi* (Shikanai-Yasuda

et al 2012); y otros modos potenciales de transmisión, como el trasplante de órganos, el contacto accidental con ciclos zoonóticos silvestres y accidentes de laboratorio (Rassi A Jr et al, 2010). Con una incidencia anual de 28.000 casos en América Latina, se estima que la enfermedad de Chagas afecta alrededor de seis millones de personas y causa casi 12.000 muertes cada año. Se calcula que alrededor de 65 millones de personas se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad (OPS, 2019). Si bien se han logrado avances significativos en la prevención y el control de la transmisión del parásito (Carlier et al, 2019), la atención médica de las personas in-

fectadas por *T. cruzi* se ha rezagado durante muchos años debido a los problemas en el diagnóstico y el tratamiento.

La infección pasa por una fase aguda, evolucionando a una fase crónica con ausencia de síntomas detectables en el 60-70 % de los pacientes infectados, o crónica sintomática, con diferentes grados de progresión y gravedad que incluyen trastornos cardíacos y/o digestivos como consecuencia de la enfermedad (Rassi A Jr et al, 2010). La fase aguda se caracteriza por una elevada parasitemia, con parásitos detectables en sangre. Sin embargo, la mayoría de los casos pasan desap-

cibidos porque los síntomas suelen ser escasos e inespecíficos, y el personal médico puede no sospechar la infección por *T. cruzi*. En general, la fase aguda se resuelve con una disminución de la carga parasitaria después del primer mes de la infección primaria (Rassi A Jr et al, 2010). Así, la mayoría de las infecciones agudas por *T. cruzi* progresan a una fase crónica silenciosa, también denominada enfermedad de Chagas crónica indeterminada o asintomática que se caracteriza por una parasitemia baja e intermitente. Como la mayoría de las personas con enfermedad de Chagas crónica asintomática desconocen su estado de infección, es posible que solo se les diagnostique cuando donen sangre o se sometan a un control de salud.

El diagnóstico de infección por *T. cruzi* debe incluir, como en cualquier enfermedad infecciosa datos respaldados por la clínica y la epidemiología, confirmados o no por pruebas de laboratorio. El diagnóstico de laboratorio incluye pruebas parasitológicas (detección directa o indirecta del parásito en sangre) y serológicas (detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* en el suero) (Luquetti et al, 2017). Los individuos infectados excepcionalmente buscan atención médica durante la fase aguda estableciéndose la infección sin un diagnóstico oportuno, y como se mencionó anteriormente, los síntomas suelen ser muy leves y atípicos, por lo que a menudo se confunden clínicamente. En contraposición, durante la fase crónica, es más frecuente la consulta médica aumentado las chances del debido diagnóstico. Las pruebas de laboratorio que se ordenarán dependen de la sospecha de cuál es la fase de la enfermedad que atraviesa el individuo infectado. Para aquellos casos inusuales durante la fase aguda, que dura solo por 1-2 meses, las pruebas parasitológicas son obligatorias.

Por otra parte, en la fase crónica que dura toda la vida, las pruebas serológicas son el método de diagnóstico de elección. Como ninguna prueba de diagnóstico serológico actual tiene la precisión requerida, la OPS/OMS recomiendan al menos dos pruebas con diferentes principios técnicos para confirmar la infección por *T. cruzi*.

■ 1-MÉTODOS PARASITOLÓGICOS

1a- Directos: Los principales métodos directos se esquematizan en la Figura 1. Su formato más simple consiste en buscar los parásitos en una gota de sangre fresca, colocada entre dos láminas de vidrio (Figura 1A). Con la ayuda de lentes de objetivo de 40X (aumenta 40 veces) o reconociéndolos entre los glóbulos rojos por contraste de fase, se pueden detectar los parásitos con su movimiento ondulante característico. Otro método de observación al microscopio óptico es la técnica de gota gruesa, donde se colocan 2 o 3 gotas de sangre en un portaobjetos y luego se realiza un frotis o barrido para fijar la muestra y una coloración para una mejor observación de los parásitos con un aumento de 100 veces (Figura 1A) (Apt et al, 2008). Cuando no se observan al microscopio y persiste la sospecha clínica, se puede aplicar un método de concentración para aumentar la sensibilidad (Luquetti et al, 2000).

El método de Strout requiere de 2 a 5 mL de sangre venosa sin anticoagulantes y conlleva pasos de centrifugación de la sangre a fin de concentrar los parásitos en un volumen menor (Figura 1 A) (Strout, 1962). Al igual que en otros procedimientos de observación microscópica, la sensibilidad de este método depende en gran medida de la experiencia del operador y del tiempo de trabajo disponible para dedicar al examen de la muestra, que suele ser limitado

en los establecimientos de salud que atienden a comunidades de zonas endémicas.

En recién nacidos o neonatos, dado que se dispone de un volumen de sangre muy bajo, se debe utilizar el método de microhematocrito llenando hasta 4 - 6 capilares (Figura 1B), o el micrométodo en tubo (Figura 1B), que después de centrifugar, se observa la interfaz entre los glóbulos rojos y el plasma en un microscopio (Freilij et al, 1994, Mora et al, 2005).

1b- Indirectos: Se basan en la proliferación de parásitos en animales o en sistemas de cultivo *in vitro*. El xenodiagnóstico fue el primer procedimiento utilizado cuando se describía la enfermedad. Consiste en alimentar a los insectos triatominos con la sangre de los pacientes y, luego de 30 a 60 días de haberlos alimentado, se examina sus heces (excrementos) para detectar la presencia de parásitos (Figura 2). Antiguamente, se colocaban los insectos triatominos en una caja sobre los brazos y las piernas de las personas analizadas, pero hoy en día, la sangre heparinizada extraída del paciente es accesible a los insectos a través de una membrana de látex (xenodiagnóstico artificial) (dos Santos et al, 1995) Sin embargo, estas técnicas han quedado en desuso, ya que sólo puede realizarse en centros de referencia donde se crían triatominos.

El hemocultivo se basa en la recolección de sangre del caso sospechoso, y el agregado de medio estéril para favorecer el crecimiento de los tripomastigotes (forma sanguínea del parásito) presente en la muestra (Figura 2). La observación del cultivo debe realizarse mensualmente durante seis meses para llegar a un diagnóstico y los parásitos en este cultivo pasan a la forma epimastigo-

te (forma presente en la vinchuca). (de Castro et al, 2006; Mora et al, 2005).

La inoculación de ratones con sangre de pacientes o con heces de insectos después del xenodiagnóstico es otro procedimiento factible pero rara vez

empleado (Figura 2). En este caso, la sangre de la cola de los ratones inoculados debe examinarse diariamente durante 1 a 2 meses. (Oliveira et al, 1993).

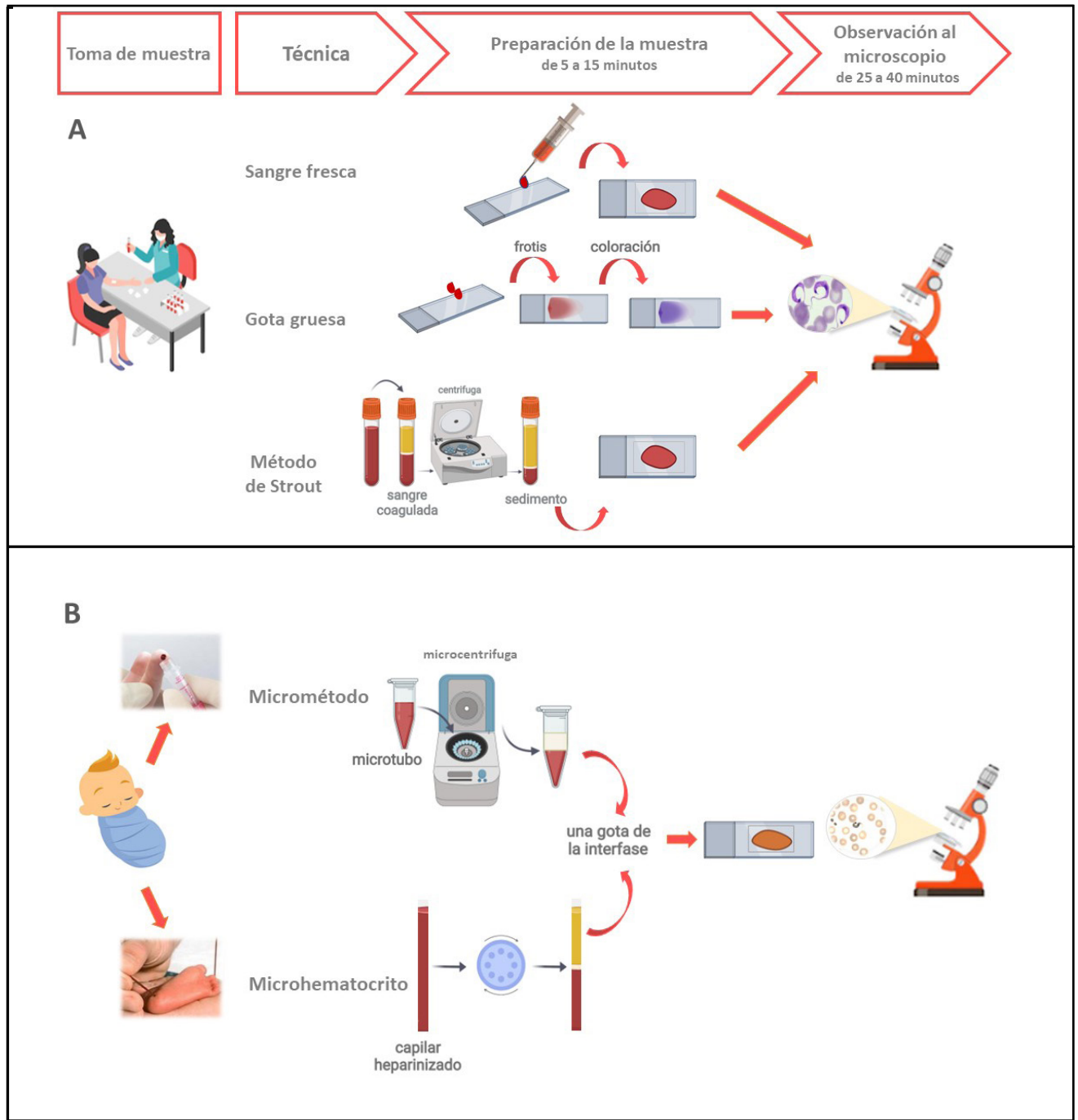


Figura 1: Métodos parasitológicos directos. Son métodos que se utilizan en la fase aguda de la enfermedad. Consisten en la observación al microscopio de la sangre del paciente para detectar los parásitos. **A.** Métodos utilizados principalmente en adultos **B.** Métodos que se utilizan al nacimiento y en los primeros meses del bebé. Estas técnicas de diagnóstico se deben realizar en el mismo día que se extrae la sangre, a medida que transcurre el tiempo se pierde sensibilidad porque los parásitos dejan de moverse de forma ondulante. (Figura creada con BioRender.com y freepik.com).

La gran dificultad de todos estos métodos parasitológicos indirectos es la baja y variable sensibilidad (alrededor del 20%), que depende en gran medida de la habilidad y experiencia del operador. Si se repite el método, la probabilidad de detección aumenta (hasta un 60% de sensibilidad), pero para algunos pacientes con parasitemia muy baja, incluso los exámenes sucesivos darán resultados negativos. (Cerisola et al, 1971)

En la práctica clínica, con la introducción de las técnicas moleculares, las estrategias basadas en los métodos parasitológicos indirectos van quedando en desuso. A principio de la década de 1990, los métodos moleculares basados en la

detección del ADN del parásito por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) surgieron como una alternativa atractiva con alta sensibilidad para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (Figura 3) (Alonso-Padilla et al, 2017). Las primeras técnicas de diagnóstico molecular utilizaban la PCR convencional o punto final, detectando mediante una electroforesis en geles de agarosa el tamaño de la molécula de ADN específica del parásito. Una década más tarde, se comenzó a utilizar una variante de la PCR convencional que simultáneamente amplifica y cuantifica el ADN parasitario (Freitas et al, 2005, Piron et al, 2007) (Figura 3). Sin embargo, requiere de un equipamiento costoso y de personal capacitado, que no siempre está disponible en

los centros de salud. Para subsanar estas dificultades, actualmente se están investigando nuevos métodos moleculares basados en la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP), el cual es más adecuado para laboratorios con recursos limitados, pues no requiere un termociclador, sino solo un bloque térmico o baño de agua (Figura 3) (Mori et al, 2001; Notomi et al, 2000, Besuschio et al, 2017, 2020). Además, la visualización del producto puede hacerse a simple vista. Más allá de PCR y LAMP, se están investigando otras tecnologías de amplificación, como la amplificación de polimerasa de recombinasa (RPA). Esta reacción isotérmica necesita una temperatura de amplificación más baja y tiempos de amplificación más cortos que



Figura 2: Métodos parasitológicos indirectos. Son métodos que se utilizan en la fase aguda de la enfermedad. Consisten en la amplificación del número de parásitos por crecimiento de estos en medio de cultivo o en un ratón seguida de la observación al microscopio de los parásitos. Son técnicas laboriosas que requieren mayor infraestructura que los métodos directos (bioterio de animales, larvario, cuarto de cultivo, etc.) que conllevan mucho tiempo, desde semanas hasta meses, para observar los parásitos al microscopio. (Figura creada con BioRender.com y freepik.com).

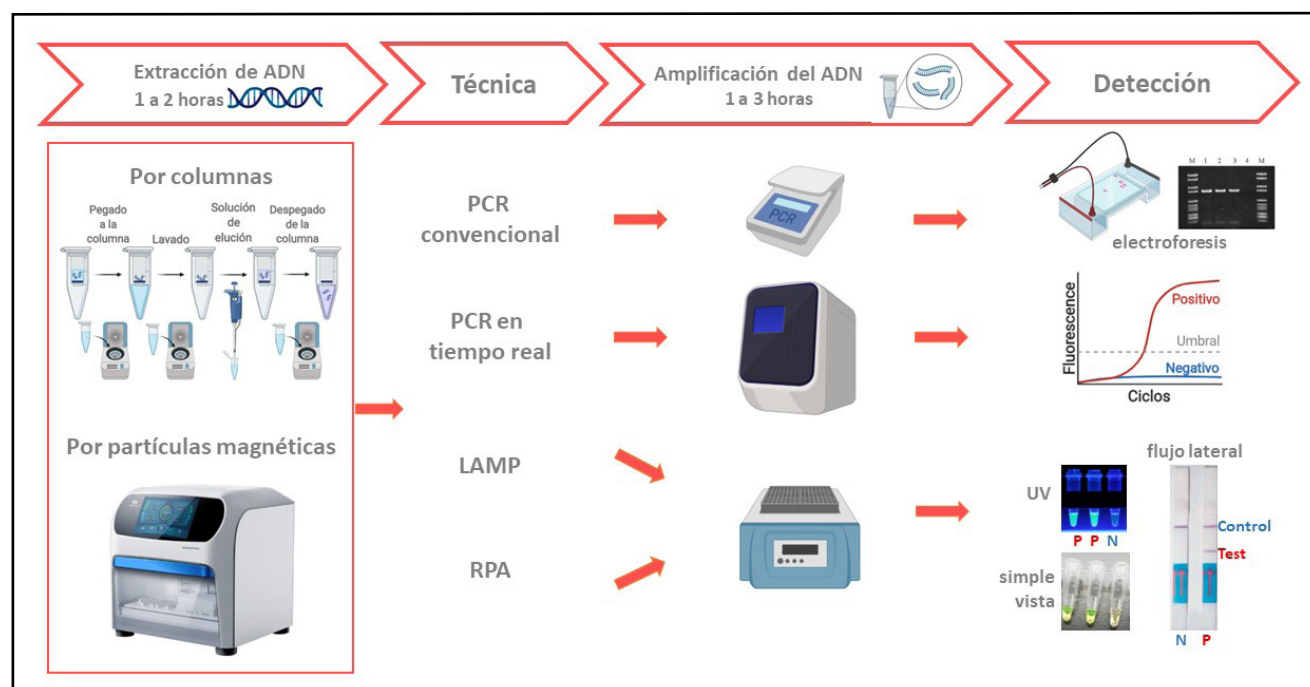


Figura 3: Métodos moleculares. Son métodos que presentan alta sensibilidad en la fase aguda de la enfermedad, mientras que debido a las bajas parasitemias en la fase crónica, su sensibilidad disminuye abruptamente. Consisten en la amplificación en miles de millones de veces de una secuencia del ADN parasitario. Todas estas técnicas requieren el aislamiento del ADN de una muestra de sangre o de tejido y un sistema de detección del producto de la reacción. En la PCR convencional se realiza una electroforesis en gels de agarosa, los fragmentos de ADN de la misma longitud forman una "banda" en el gel que se puede identificar a simple vista si el gel se tiñe con un pigmento que se une al ADN. La PCR en tiempo real es una modalidad del PCR de punto final, donde la acumulación de ADN amplificado es detectado y cuantificado a medida que la reacción avanza, es decir: "en tiempo real". Los resultados se obtienen mediante el procesamiento de datos que realiza el programa del equipo. Tanto LAMP como RPA son técnicas más modernas donde la reacción de amplificación ocurre a una única temperatura por lo que se puede realizar en un simple baño térmico. La detección puede ser a simple vista o a la luz ultravioleta (UV) o en tira reactiva similar a las pruebas de embarazo. (Figura creada con BioRender.com).

LAMP, que ha mostrado un buen desempeño en comparación con la PCR en muestras de reservorios domésticos en México. (Jiménez-Coello et al, 2018).

■ 2-MÉTODOS SEROLÓGICOS

La mayoría de los ensayos empleados durante los últimos 40 años para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica son las pruebas serológicas convencionales para detectar los niveles de inmunoglobulinas G (IgG) anti-*T. cruzi*. En la actualidad, los métodos serológicos más ampliamente utilizados son:

2a- El ensayo de hemaglutinación indirecta **-HAI-**: es el ensayo más simple y menos costoso. El procedimiento tiene pocos pasos, lo que reduce los errores de manipulación. Se ponen en contacto glóbulos rojos sensibilizados de una especie animal (generalmente ovino) y suero del paciente durante 1 ó 2 horas. Después de este tiempo, si los anticuerpos específicos del parásito están presentes en el suero, los glóbulos rojos forman una red en el fondo del tubo o pozo, que se lee a simple vista (Figura 4).

2b- El ensayo de inmunofluorescencia indirecta **-IFI-**: requiere

microscopía de fluorescencia, exige varios pasos de incubación, por lo que requiere mucho tiempo y la interpretación de los resultados depende del operador. Su principal ventaja es su alta sensibilidad (>99%), pero la especificidad no es tan buena (>96%), especialmente debido a la reactividad cruzada con varias enfermedades (Figura 4).

2c- El ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas **-ELISA-**: incluye el contacto del suero de los pacientes con antígenos del parásito adheridos al material plástico tratado de un pocillo de una microplaca. Las pruebas de ELISA de primera ge-

neración se desarrollaron originalmente utilizando homogeneizados de parásitos totales y, más tarde, usando fracciones antigénicas purificadas del parásito (Figura 4).

Para todas estas pruebas convencionales, los resultados obtenidos pueden ser no reactivos (negativos), reactivos (positivos) o "borderline" (zona gris), y dos de ellos deben ser concordantemente positivos o negativos para garantizar la confianza en los resultados.

También se han empleado pruebas serológicas no convencionales basadas en diferentes principios para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas crónica. Estos han sido desarrollados tras el descubri-

miento y validación de familias antigénicas inmunogénicas de *T. cruzi*. Las estrategias de ingeniería genética han logrado la construcción de antígenos recombinantes adecuados a diferentes formatos de ensayos inmunológicos, tales como mezcla de antígenos recombinantes (Umezawa et al, 2003) péptidos cortos (Mucci et al, 2017) o matrices antigénicas basadas en proteínas quiméricas compuestas por fragmentos de aminoácidos inmunodominantes repetitivos y conservados de varias proteínas de *T. cruzi*. (Del Rei et al, 2019).

Dichos antígenos recombinantes se han utilizado en pruebas ELISA de última generación que tienen mayor sensibilidad y especificidad que los ensayos basados en antígenos de

lisado completo. Alternativamente, los ensayos inmunológicos recombinantes pueden utilizar formatos de detección de alta sensibilidad, siendo la quimioluminiscencia la más empleada. Este formato de ensayo está disponible comercialmente a un alto costo y se usa en muchos bancos de sangre y algunos laboratorios clínicos. Su sensibilidad ronda el 100% y su especificidad también es notablemente alta, lo que llevó a algunos autores a sugerir que podría utilizarse como diagnóstico único.

Otras pruebas no convencionales son los ensayos líticos que incluyen la citometría de flujo (no disponible comercialmente) y RIPA (radioinmunoensayo), que no están disponibles comercialmente. (Luquetti et al, 2017).

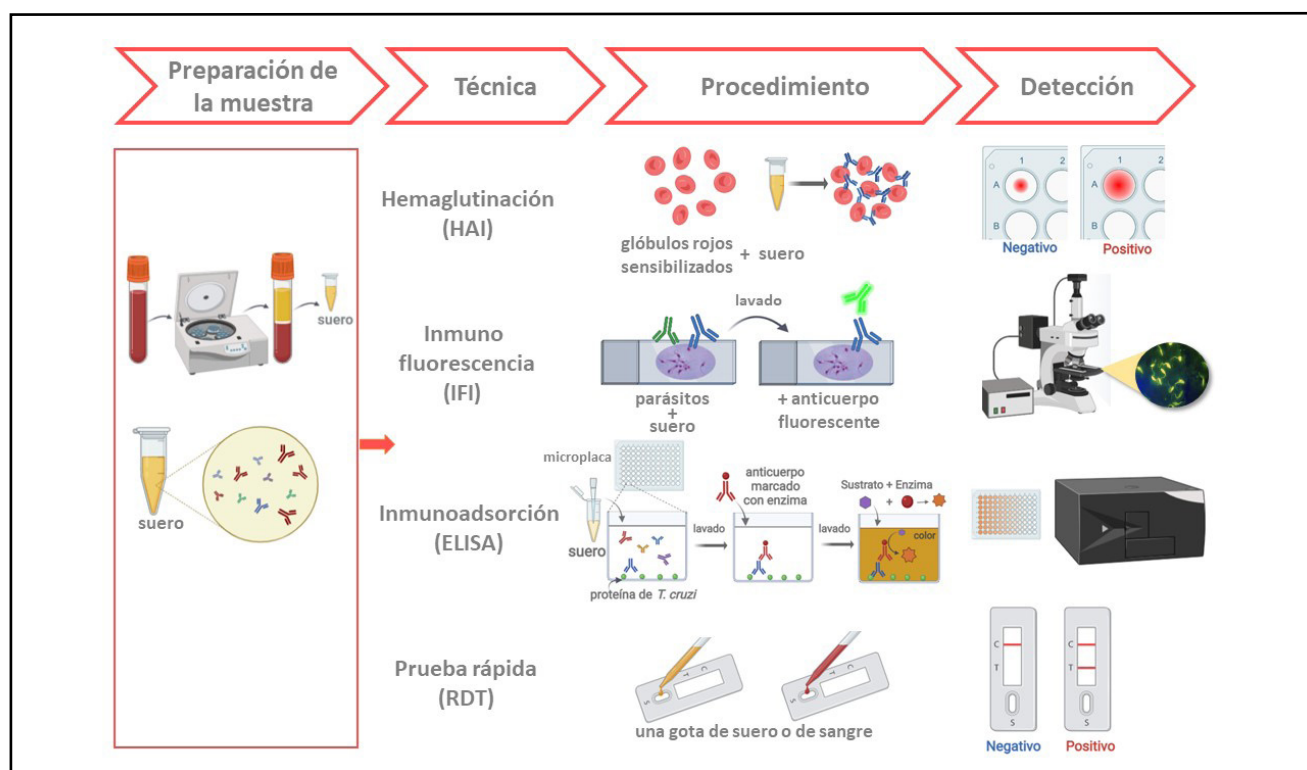


Figura 4: Métodos serológicos. Son métodos que presentan alta sensibilidad en la fase crónica siendo el estándar de oro para el diagnóstico de la enfermedad. El HAI y los RDT son los métodos más sencillos que pueden ser interpretados a simple vista por comparación con el control. El método más utilizado es el ELISA, pero requiere de un lector de placas y lleva dos días en total para tener el resultado. El IFI se suele utilizar como tercer método cuando se tienen resultados discordantes (es decir: una prueba positiva, segunda prueba negativa), pues según la OMS es necesario dos pruebas positivas para el diagnóstico certero por *T. cruzi*. (Figura creada con BioRender.com).

Las pruebas Western Blot o Dot Blot también se emplean para confirmar la infección mediante el reconocimiento de antígenos específicos. El TESA blot (*Trypanosoma Excreted secreted antigens*) se utiliza en algunos países de América Latina para la confirmación del serodiagnóstico (Umezawa et al, 2009).

2d- Las Pruebas de Diagnóstico Rápido **-RDT-** (del inglés, "*Rapid Diagnostic Test*") son una alternativa valiosa para regiones remotas, donde las demoras en el procesamiento de las pruebas de ELISA dificultan el diagnóstico de infecciones crónicas por *T. cruzi* (Angheben et al, 2019). Estos ensayos inmunocromatográficos de RDT son similares a los que se utilizan para el diagnóstico del embarazo, el VIH, etc. En el caso de infecciones por *T. cruzi*, se sensibiliza una membrana con varios antígenos recombinantes y se pone en contacto con la muestra del paciente (Figura 4). Algunos de ellos trabajan con un pequeño volumen de sangre entera que se puede obtener por pinchazo en el dedo, lo que facilita mucho la logística y la predisposición de los pacientes a hacerse la prueba. No requieren equipo específico para la incubación o lectura de resultados y permiten una rápida entrega de resultados entre 10 min a menos de 1 hora, lo que facilita que la persona analizada pueda salir de la consulta con un resultado.

■ ALCANCES, LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS

Todavía son necesarias mejoras adicionales en los algoritmos y métodos de diagnóstico, así como un acceso más amplio a ellos, para poder controlar la enfermedad de Chagas. En las encuestas epidemiológicas y el diagnóstico de sujetos con infección crónica, se espera que las pruebas rápidas amplíen el acceso al diagnóstico en grandes áreas don-

de comúnmente no se encuentran laboratorios bien equipados y personal calificado (Luquetti et al, 2003; Shah et al, 2014). Sería ideal contar con un único método serológico rápido (RDT) para diagnosticar Chagas en áreas endémicas.

También se requieren métodos más sencillos y rápidos de extracción de ácidos nucleicos para fines de diagnóstico molecular en puntos de atención de salud, de baja complejidad y equipamiento no sofisticado. Estudios prospectivos de campo son necesarios para establecer su verdadero potencial para el diagnóstico de la enfermedad aguda, incluida la transmisión congénita. En este sentido, es necesario reevaluar la precisión de la detección molecular de la infección a partir de muestras de sangre de cordón umbilical para un diagnóstico precoz del Chagas congénito. Todavía no está claro cuál es la tasa de resultados falsos positivos cuando se usa esta fuente de muestra, ya que es probable que pueda contaminarse con ADN del parásito de la sangre materna y, por lo tanto, dé lugar a detecciones de falsos positivos (Benatar et al, 2021).

Por otro lado, dado que varios estudios reportaron el uso de sangre seca en papel filtro tanto para diagnóstico serológico (Zicker et al, 1990; Holguín et al, 2013) como para detectar ADN parasitario, (Sánchez et al, 2016) explorando el uso de las tarjetas Whatman 903 actualmente empleadas para el tamizaje neonatal de enfermedades genéticas (Besuschio et al, 2020) o tarjetas FTA, (Ahmed et al, 2011; Hashimoto et al, 2019), el uso de estos soportes sólidos sería muy interesante para apoyar los ensayos de diagnóstico molecular, una vez que se demuestre una alta sensibilidad y especificidad. Su combinación con un sistema de aislamiento de ADN de bajo costo con una impresora 3D modi-

ficada ya se ha explorado, (Chan et al, 2018; Wehrendt et al, 2020), por lo que valdría la pena diseñar estudios para validarlos en terreno como diagnóstico de *T. cruzi*.

Por último, actualmente se están explorando métodos de diagnóstico más sensibles, rápidos y económicos basados en nanotecnología, que utilizan nano-biosensores capaces de detectar cantidades muy pequeñas del parásito (Castro-Sesquen et al, 2014) o basados en aptámeros -secuencias de ADN o ARN de cadena simple que adoptan la forma de estructuras tridimensionales únicas que reconocen un blanco específico con gran afinidad- (Nagarkatti, et al, 2014), lo que permitirá avanzar un paso más en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

■ REFERENCIAS

- Ahmed, H. A., MacLeod, E. T., Hide, G., Welburn, S. C., & Picozzi, K. (2011). The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system. *Parasites & vectors*, 4, 68.
- Alonso-Padilla, J., Gallego, M., Schijman, A. G., & Gascon, J. (2017). Molecular diagnostics for Chagas disease: up to date and novel methodologies. *Expert review of molecular diagnostics*, 17(7), 699–710.
- Angheben, A., Boix, L., Buonfrate, D., Gobbi, F., Bisoffi, Z., Pupella, S., Gandini, G., & Aprili, G. (2015). Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood transfusion*, 13(4), 540–550.
- Angheben, A., Buonfrate, D., Cruciani, M., Jackson, Y., Alonso-

- Padilla, J., Gascon, J., Gobbi, F., Giorli, G., Anselmi, M., & Bisoffi, Z. (2019). Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(5), e0007271.
- Apt B, W., Heitmann G, I., Jercic L, M. I., Jofré M, L., Muñoz C Del V, P., Noemí H, I., San Martín V, A. M., Sapunar P, J., Torres H, M., & Zulantay A, I. (2008). Parte V. Diagnóstico de laboratorio [Part V. Laboratory diagnosis of Chagas disease]. *Revista chilena de infectología : organo oficial de la Sociedad Chilena de Infectología*, 25(5), 380–383.
- Benatar, A. F., Danesi, E., Besuschio, S. A., Bortolotti, S., Cafferata, M. L., Ramirez, J. C., Albizu, C. L., Scollo, K., Baleani, M., Lara, L., Agolti, G., Seu, S., Adamo, E., Lucero, R. H., Irazu, L., Rodriguez, M., Poeylaut-Palena, A., Longhi, S. A., Esteva, M., Althabe, F., ... Congenital Chagas Disease Study Group (2021). Prospective multicenter evaluation of real time PCR Kit prototype for early diagnosis of congenital Chagas disease. *EBioMedicine*, 69, 103450.
- Besuschio, S. A., Llano Murcia, M., Benatar, A. F., Monnerat, S., Cruz, I., Picado, A., Curto, M., Kubota, Y., Wehrendt, D. P., Pavia, P., Mori, Y., Puerta, C., Ndung'u, J. M., & Schijman, A. G. (2017). Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(7), e0005779.
- Besuschio, S. A., Picado, A., Muñoz-Calderón, A., Wehrendt, D. P., Fernández, M., Benatar, A., Diaz-Bello, Z., Irurtia, C., Cruz, I., Ndung'u, J. M., Cafferata, M. L., Montenegro, G., Sosa Estani, S., Lucero, R. H., Alarcón de Noya, B., Longhi, S. A., & Schijman, A. G. (2020). *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loo-pamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(8), e0008402.
- Carlier, Y., Altcheh, J., Angheben, A., Freilij, H., Luquetti, A. O., Schijman, A. G., Segovia, M., Wagner, N., & Albajar Vinas, P. (2019). Congenital Chagas disease: Updated recommendations for prevention, diagnosis, treatment, and follow-up of newborns and siblings, girls, women of childbearing age, and pregnant women. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(10), e0007694.
- Castro-Sesquen, Y. E., Gilman, R. H., Galdos-Cardenas, G., Ferrufino, L., Sánchez, G., Valencia Ayala, E., Liotta, L., Bern, C., Luchini, A., & Working Group on Chagas Disease in Bolivia and Peru (2014). Use of a novel chagas urine nanoparticle test (chunap) for diagnosis of congenital chagas disease. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(10), e3211.
- Cerisola, J. A., Rohwedder, R. W., & Del Prado, C. E. (1971). Rendimiento del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica humana utilizando ninfas de diferentes especies de triatominos [Yield of xenodiagnosis in human chronic Chagas' infection using nymphs of different species of triatomid bugs]. *Boletín chileno de parasitología*, 26(1), 57–58.
- Chan, K., Wong, P. Y., Parikh, C., & Wong, S. (2018). Moving toward rapid and low-cost point-of-care molecular diagnostics with a repurposed 3D printer and RPA. *Analytical biochemistry*, 545, 4–12.
- de Castro, A. M., Luquetti, A. O., Rassi, A., Chiari, E., & Galvão, L. M. (2006). Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology research*, 99(4), 379–383.
- Del-Rei, R. P., Leony, L. M., Celedon, P., Zanchin, N., Reis, M., Gomes, Y. M., Schijman, A. G., Longhi, S. A., & Santos, F. (2019). Detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies by chimeric antigens in chronic Chagas disease-individuals from endemic South American countries. *PloS one*, 14(4), e0215623.
- dos Santos, A. H., da Silva, I. G., & Rassi, A. (1995). Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos [A comparative study between natural and artificial xenodiagnosis in chronic Chagas' disease patients]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28(4), 367–373.
- Freilij H, Altcheh J. (1994) Chagas congénito. In: *Enfermedad de Chagas*, Ed. Storino R, Milei J. Buenos Aires, Edit. Doyma.
- Freitas, J. M., Lages-Silva, E., Crema, E., Pena, S. D., & Macedo, A. M. (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *International journal for parasitology*, 35(4), 411–417.
- Hashimoto, M., Bando, M., Kido, J. I., Yokota, K., Mita, T., Kajimoto, K., & Kataoka, M. (2019). Nu-

- cleic acid purification from dried blood spot on FTA Elute Card provides template for polymerase chain reaction for highly sensitive Plasmodium detection. *Parasitology international*, 73, 101941.
- Holguín, A., Norman, F., Martín, L., Mateos, M. L., Chacón, J., López-Vélez, R., & Pérez-Molina, J. A. (2013). Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 20(8), 1197–1202.
- Jimenez-Coello, M., Shelite, T., Castellanos-Gonzalez, A., Saldarriaga, O., Rivero, R., Ortega-Pacheco, A., Acevedo-Arcique, C., Amaya-Guardia, K., Garg, N., Melby, P., & Travi, B. L. (2018). Efficacy of Recombinase Polymerase Amplification to Diagnose *Trypanosoma cruzi* Infection in Dogs with Cardiac Alterations from an Endemic Area of Mexico. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 18(8), 417–423.
- Luquetti, A. O., Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, S., Añez, N., Zingales, B., Ramgel-Aldao, R., Gonzalez, A., Levin, M. J., Umezawa, E. S., & Franco da Silveira, J. (2003). Chagas' disease diagnosis: a multicentric evaluation of Chagas Stat-Pak, a rapid immunochromatographic assay with recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 46(4), 265–271.
- Luquetti AO, Rassi A. In: Brener Z, Andrade AZ, Barral-Neto M, editors. (2000) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Diagnostico Laboratorial da Infeccao pelo Trypanosoma cruzi*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 344-378.
- Luquetti AO, Schmuñis GA. In: Telleria J, Tibayrenc M. (2017) *American Trypanosomiasis. Chagas Disease. One Hundred Years of Research. Diagnosis of Trypanosoma cruzi Infection*. 2nd. Edition. Elsevier, Amsterdam, 29: 687-730.
- Mora, M. C., Sanchez Negrette, O., Marco, D., Barrio, A., Ciaccio, M., Segura, M. A., & Basombrío, M. A. (2005). Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *The Journal of parasitology*, 91(6), 1468–1473.
- Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., & Notomi, T. (2001). Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and biophysical research communications*, 289(1), 150–154.
- Mucci, J., Carmona, S. J., Volcovich, R., Altcheh, J., Bracamonte, E., Marco, J. D., Nielsen, M., Buscaglia, C. A., & Agüero, F. (2017). Next-generation ELISA diagnostic assay for Chagas Disease based on the combination of short peptidic epitopes. *PLoS neglected tropical diseases*, 11(10), e0005972.
- Nagarkatti, R., de Araujo, F. F., Gupta, C., & Debrabant, A. (2014). Aptamer based, non-PCR, non-serological detection of Chagas disease biomarkers in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(1), e2650.
- Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*, 28(12), E63.266
- Oliveira, E. C., Stefani, M. M., Luquetti, A. O., Vêncio, E. F., Moreira, M. A., Souza, C., & Rezen-de, J. M. (1993). *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 26(1), 25–33.
- OMS - World Health Organization. (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates [Internet]. Geneva: WHO. Available from: <http://www.who.int/wer/2015/wer9006.pdf?ua=1>.
- OMS. (2014) Blood donor counselling: implementation guidelines, Geneva: World Health Organization.
- Organización Panamericana de la Salud (2019). Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. [Spanish] Available at: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/10665.2/49653>
- Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, 391(10115), 82–94.
- 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 tropica*, 103(3), 195–200.

- Rassi, A., Jr, Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* (London, England), 375(9723), 1388–1402.
- Sánchez, A. G., Alvarellos, E., Kohout, I., Rodríguez Schulz, D. G., Cordeiro, E., Caeiro, J. P., & Alvarellos, T. (2016). Detection of *Trypanosoma cruzi* and Treatment Monitoring by PCR from Dried Blood Spot Samples in Children. *Detección de Trypanosoma cruzi y Monitoreo del tratamiento con PCR en gotas de sangre en papel. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas* (Cordoba, Argentina), 73(3), 176–180.
- Santos, E. F., Silva, Â., Leony, L. M., Freitas, N., Daltro, R. T., Regis-Silva, C. G., Del-Rei, R. P., Souza, W. V., Ostermayer, A. L., Costa, V. M., Silva, R. A., Ramos, A. N., Jr, Sousa, A. S., Gomes, Y. M., & Santos, F. (2020). Acute Chagas disease in Brazil from 2001 to 2018: A nationwide spatiotemporal analysis. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(8), e0008445.
- Shah, V., Ferrufino, L., Gilman, R. H., Ramirez, M., Saenza, E., Malaga, E., Sanchez, G., Okamoto, E. E., Sherbuck, J. E., Clark, E. H., Galdos-Cardenas, G., Bozo, R., Flores-Franco, J. L., Colanzi, R., Verastegui, M., & Bern, C. (2014). Field evaluation of the In-Bios Chagas detect plus rapid test in serum and whole-blood specimens in Bolivia. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 21(12), 1645–1649.
- Shikanai-Yasuda, M. A., & Carvalho, N. B. (2012). Oral transmission of Chagas disease. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(6), 845–852.
- Strout RG. (1962). A method for concentrating hemoflagellates. *The Journal of parasitology*, 48, 100.
- Umezawa, E. S., Bastos, S. F., Coura, J. R., Levin, M. J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., Zingales, B., Luquetti, A. O., & da Silveira, J. F. (2003). An improved serodiagnostic test for Chagas' disease employing a mixture of *Trypanosoma cruzi* recombinant antigens. *Transfusion*, 43(1), 91–97.
- Umezawa, E. S., Souza, A. I., Pinedo-Cancino, V., Marcondes, M., Marcili, A., Camargo, L. M., Camacho, A. A., Stolf, A. M., & Teixeira, M. M. (2009). TESA-blot for the diagnosis of Chagas disease in dogs from co-endemic regions for *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma evansi* and *Leishmania chagasi*. *Acta tropica*, 111(1), 15–20.
- Wehrendt, D. P., Gómez-Bravo, A., Ramirez, J. C., Cura, C., Pech-May, A., Ramsey, J. M., Abril, M., Guhl, F., & Schijman, A. G. (2019). Development and evaluation of a duplex TaqMan qPCR assay for detection and quantification of *Trypanosoma cruzi* infection in domestic and sylvatic reservoir hosts. *Parasites & vectors*, 12(1), 567.
- Zicker, F., Smith, P. G., Luquetti, A. O., & Oliveira, O. S. (1990). Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. *Bulletin of the World Health Organization*, 68(4), 465–471.