

Diagnóstico de la infección con *Trypanosoma cruzi*: Avances y retos

Diagnosis of Trypanosoma cruzi infection: Advances and challenges

Margarita Rubio-Ortiz ^{1&}; Laura Alejandra Hernández-López ^{1&}; Anahí Pérez-Galicia ¹,
Carmen Guzmán-Bracho ²; Santiago Martínez-Calvillo ³; Rebeca Georgina Manning-Cela ^{1*}.

<https://doi.org/10.25009/rmuv.2020.1.4>

Palabras clave: Enfermedad de Chagas, diagnóstico, parásitos, proteínas recombinantes, cepas.

Keywords: Chagas disease, diagnosis, parasites, recombinant proteins, strains.

Resumen

Introducción. *Trypanosoma cruzi* es el protozooario hemoflagelado causante de la enfermedad de Chagas (ECH), un padecimiento endémico de Latinoamérica que es altamente incapacitante e incurable. Además de su diferente distribución geográfica, las cepas de *T. cruzi* tienen variabilidad intraespecífica por lo que son clasificadas en siete DTUs (TcI-TcVI y Tcbat) que presentan diversidad biológica, bioquímica, molecular y antigénica, que se relaciona con el desarrollo de los distintos cuadros clínicos de la enfermedad, la eficiencia del diagnóstico y la respuesta al tratamiento. Existe una gran variabilidad en la sensibilidad y especificidad de las pruebas serodiagnósticas y hasta ahora, no existe una prueba estándar de oro para un diagnóstico completamente confiable. **Objetivo.** Revisar los avances obtenidos en la búsqueda de antígenos útiles para el serodiagnóstico de la ECH. **Materiales y métodos.** Se realizó una revisión sistemática de tipo cualitativa, de reportes relacionados al serodiagnóstico de la infección por *T. cruzi* encontrados en PubMed. **Resultados.** El serodiagnóstico convencional con antígenos del parásito completo es sensible pero no tiene alta especificidad. Por ello, se utilizan también pruebas no convencionales con antígenos recombinantes o péptidos sintéticos que aumentan la especificidad. Distintos enfoques han permitido la identificación de moléculas con potencial diagnóstico, mostrando la necesidad del uso de cócteles de antígenos re-

¹Departamento de Biomedicina Molecular, CINVESTAV-IPN, CDMX, México ²Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos, SS, CDMX, México. ³Unidad de Biomedicina, FES Iztacala, UNAM, Tlalnepantla, México. ^{*}Estos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo

*Autor de correspondencia:

Rebeca Georgina Manning-Cela
Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, México CDMX. Código Postal 07360. Apartado Postal: 14-740, 07000 México, CDMX. Tel: (52) (55) 5747-3800 ext. 5010 E-mail: rmanning@cinvestav.mx

Agradecimientos:

Este trabajo fue parcialmente apoyado con los proyectos CONACYT No. 233346 y No. 6671 otorgados a R. G. Manning-Cela. Contribuciones de los autores MRO, LAHL y APG realizaron la búsqueda bibliográfica. CGB y SMC participaron en la edición del manuscrito. RGMC concibió el trabajo, analizó la literatura, escribió y editó el manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito.

Conflicto de intereses: *Los autores declaran no tener conflicto de intereses*

combinantes, mezclas de péptidos sintéticos o antígenos multiepitope para una mejor sensibilidad y especificidad de las pruebas y para la detección de la infección con cualquiera de los DTUs del parásito. **Conclusiones.** Aun cuando se han identificado diversos antígenos con potencial uso diagnóstico, continúan los esfuerzos para la identificación de nuevos y mejores antígenos. Los avances recientes de la proteómica a gran escala acoplada a inmunoensayos e inmunogenómica, ofrecen una oportunidad en la búsqueda no solo de biomarcadores para el diagnóstico, sino también para el tratamiento y pronóstico oportuno de la enfermedad de Chagas.

Abstract

Introduction. *Trypanosoma cruzi* is the protozoan hemoflagellate that causes Chagas disease, an endemic illness in Latin America that is highly incapacitating and incurable. The parasite strains have great intraspecific variability, being classified into seven DTUs (from TcI to TcVI and Tcbat). In addition to their different geographical distribution, *T. cruzi* strains show biological, biochemical, molecular and antigenic diversity, which is related to the development of the different clinical symptoms of the disease, the efficiency of diagnosis and treatment response. Serodiagnosis tests show wide variation in their sensitivity and specificity, and so far, it doesn't exist a standard gold test for a completely reliable diagnosis. **Objective.** To review the advances made in the search for useful antigens for serodiagnosis of Chagas disease. **Materials and methods.** We performed a qualitative systematic review of reports related to serodiagnosis of *T. cruzi* infection found in PubMed. **Results.** Conventional serodiagnosis with complete parasite antigens

is sensitive but does not have high specificity. Thus, unconventional tests with recombinant antigens or synthetic peptides that increase specificity are also used. Different approaches have allowed the identification of molecules with potential diagnostic, showing that cocktails of recombinant antigen, mixtures of synthetic peptides or multiepitope antigens are necessary for a better sensitivity and specificity of the tests and infection detection with any *T. cruzi* DTU. **Conclusions.** Even though several antigens with potential use for diagnosis have been identified, efforts continue to identify new and better antigens. Recent advances in large-scale proteomics linked with immunoassays and immunogenomics offer an opportunity in the search not only for biomarkers for diagnosis, but also for the treatment and timely prognosis of Chagas disease.

Introducción

La enfermedad de Chagas (ECH) es endémica de América Latina, por lo que también es llamada Tripanosomiasis Americana. Este padecimiento es causado por *T. cruzi*, un protozoario parásito hemoflagelado de importancia médica y biológica, que es miembro del orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae, en donde también se agrupan otros parásitos patógenos de mamíferos como *Trypanosoma brucei* y *Leishmania*.

Se ha estimado que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas con este parásito, localizadas principalmente en zonas endémicas de 21 países de América Latina y que, debido a la migración de personas se ha propagado la infección a países no endémicos (WHO, 2020) como Estados Unidos y Canadá, así como varios países de Europa y el oeste del pacífico, convirtiendo a la ECH en

un problema de salud global (Rassi, Rassi, & Marin-Neto, 2010). Se calcula que anualmente hay 30,000 nuevos casos a través de todas las formas de transmisión y 12,000 muertes anuales, además de que 100 millones de personas están en riesgo de contraer la infección (OPS, 2020). A través de un modelo de simulación computacional, se ha estimado que los costos globales de las personas infectadas con *T. cruzi* ascienden anualmente a \$7.19 billones de dólares americanos por atención médica y a \$188.80 billones de dólares americanos por años de vida ajustados a discapacidad, lo que supera a otras enfermedades globales importantes como, la infección con rotavirus (\$2 billones de dólares americanos) y el cáncer cervical (\$4.7 billones de dólares americanos) (Lee, Bacon, Bottazzi, & Hotez, 2013). Para el caso de Latinoamérica se calcula que la ECH genera un costo en salud de aproximadamente \$500 millones de dólares americanos y una pérdida anual de 770,000 años de vida por muerte prematura o pérdida de años productivos por discapacidad (OPS-OMS, 2018). Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera a la ECH dentro del grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas y como el principal problema de salud pública en Latinoamérica (WHO, 2020). En México, de acuerdo con una revisión sistemática y el metaanálisis de diversas encuestas epidemiológicas publicada recientemente, se estimó una seroprevalencia promedio de 3.38%, sugiriendo que hay 4.06 millones de infectados en el país, siendo los estados de Jalisco, San Luis Potosí, Chiapas, Estado de México, Querétaro y Oaxaca los más afectados. También, se encontró un promedio de 0.55% de casos de infección en donadores de sangre, observándose las mayores seroprevalencias en Quintana Roo, Tabasco, Puebla, Campeche y Nayarit. Finalmente, se encontró una seroprevalencia del 2.21% en mujeres embarazadas con un estimado de 3,193 casos de infección congénita en

recién nacidos por año y 1.51% de seroprevalencia en menores de 18 años, indicando la presencia de transmisión activa. Este análisis, no sólo muestra que la infección de *T. cruzi* en México es superior a la estimada anteriormente, sino que también es el país endémico con el mayor número de casos actualmente (Arnal, Waleckx, Rico-Chavez, Herrera, & Dumonteil, 2019).

La principal fuente de infección en humanos es por transmisión vectorial, la cual representa el 80% de los casos (OPS-OMS, 2018). Esta vía de transmisión es llevada a cabo por insectos hematófagos de la familia Reduviidae, de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*, que se agrupan en 151 especies (Galvão, Carcavallo, Rocha-Da Silva, & Jurberg, 2003; Justi & Galvao, 2017; Rassi et al., 2010). En México, se encuentran 31 especies, de las cuales *Triatoma barberi*, *Triatoma dimidiata* y el complejo phyllosoma (*T. pallidipennis*, *T. longipennis*, *T. picturata*, *T. mazzotti*, *T. phyllosoma* y *T. mexicana*) son los transmisores más importantes, debido a su amplia distribución geográfica y capacidad de transmisión del parásito (Guzman-Bracho, 2001; Ramsey et al., 2000; Ramsey et al., 2015; Ramsey & Schofield, 2003). La segunda fuente de transmisión en países endémicos y primera en países no endémicos es a través de transfusión sanguínea (20%). Finalmente, en menor proporción (2-6%) están las vías de transmisión por trasplante de órganos, la materno-fetal por vía transplacentaria, la vía oral y ocasionalmente por accidentes de laboratorio (OPS-OMS, 2018). Mas de 70 géneros de mamíferos actúan como reservorios del parásito, incluyendo a marsupiales, roedores, armadillos, primates y animales domésticos, de los cuales *Didelphis virginiana*, *Neotoma* sp. y *Peromyscus* sp., son los más importantes en nuestro país (Cruz-Reyes & Pickering-Lopez, 2006; Zingales, 2018).

La transmisión de *T. cruzi* se lleva a cabo na-

turalmente en el ciclo selvático, donde la infección se transmite del insecto infectado a mamíferos silvestres y viceversa. Sin embargo, la distribución de la ECH depende del ciclo doméstico, en el que el insecto vector se encuentra en el peri-domicilio y domicilio favoreciéndose la transmisión de *T. cruzi* al humano y a animales domésticos y de corral. Por lo tanto, durante el ciclo de vida del parásito participa un gran número de hospederos, reservorios y triatomíneos vectores que mantienen a la ECH como una zoonosis que imposibilita su erradicación.

El ciclo de vida de *T. cruzi* es bifásico, comprendiendo cuatro estadios de desarrollo diferentes que se alternan entre el insecto vector (tripomastigote metacíclico y epimastigote) y el hospedero mamífero (amastigote y tripomastigote sanguíneo). En este último se desarrolla el ciclo intracelular del parásito, responsable del establecimiento de la patología de la ECH en el humano (Espinoza Gutierrez & Manning Cela, 2008). La enfermedad muestra dos fases clínicas: 1) la fase aguda, con una duración de 1 a 2 meses, que regularmente pasa desapercibida (95%) y sólo en pocos casos (5%) se observa el chagoma de inoculación o el signo de Romaña característicos del lugar de entrada del parásito; y 2) la fase crónica, que se subdivide en dos etapas: una asintomática, indeterminada o latente que dura de 10 a 30 años sin sintomatología aparente pero con serología positiva, y una etapa clínica (en 30% de los infectados) que se caracteriza por producir problemas cardíacos (Cardiopatía Chagásica Crónica o CCC) o afectación gastrointestinal por la dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon). No se conocen los factores que determinan que un individuo presente CCC o los mega-órganos, pero se ha sugerido que este histotropismo podría ser dependiente del linaje de la cepa adquirida, la respuesta inmunológica celular y humoral del individuo, la carga parasitaria

recibida o la combinación de todos estos factores (Coura & Borges-Pereira, 2010; Zingales, 2018).

El material genético de *T. cruzi* se organiza en dos estructuras bien caracterizadas. El mayor contenido de ADN (75% al 80%) se encuentra en el núcleo en forma de pequeños cromosomas no bien condensados durante la división celular, y en menor cantidad (20% al 25%) el ADN se sitúa en el cinetoplasto del parásito, el cual se localiza en el interior de su única mitocondria y cerca del corpúsculo basal o cinetosoma (Souza et al., 2011). El cinetoplasto es una estructura común entre los tripanosomátidos y la posición que guarda con respecto al núcleo, ayuda a definir el estadio de desarrollo en el que se encuentra el parásito. *T. cruzi* tiene un genoma nuclear diploide, distribuido en pares de cromosomas homólogos (El-Sayed et al., 2005). El tamaño de sus cromosomas es variable debido, entre otras razones, a que las cepas y clones del parásito muestran variaciones de hasta un 48% en su tamaño y contenido de ADN (Lewis et al., 2009). Estas divergencias han llevado a clasificar a las cepas de *T. cruzi* en siete Unidades de Tipificación Discretas o DTU (por sus siglas en inglés *Discrete Typing Units*) de TcI-TcVI y Tcbat (Zingales et al., 2012). Algunos estudios sugieren que el genoma de las cepas que pertenecen a TcI es más pequeño que el de las cepas pertenecientes a las otras DTUs y se cree que este hecho se debe a la relación entre distancias genotípicas y la cantidad de secuencias repetitivas, como lo sugieren los análisis de la secuencia satélite de 195-pb (Briones, Souto, Stolf, & Zingales, 1999; Henriksson et al., 2002; Pedroso, Cupolillo, & Zingales, 2003; Souza et al., 2011; Vargas, Pedroso, & Zingales, 2004). Estas diferencias en el contenido de ADN reflejan la gran plasticidad genómica del parásito y su posible participación en la generación de la diversidad fenotípica entre sus cepas (Zingales, 2018). Por lo tanto, *T. cruzi* com-

prende un conjunto de poblaciones de cepas que circulan entre vectores, hombre y reservorios tanto domésticos como selváticos.

Se han realizado aislamientos del parásito de diversos hospederos, demostrándose una gran variación intraespecífica en cuanto a la morfología de su forma sanguínea, la virulencia, la habilidad para inducir lesiones, la susceptibilidad a agentes quimioterapéuticos, la constitución antigénica y la capacidad de infección en las células hospederas. Se ha propuesto que dicha heterogeneidad pudiera estar influenciada por el hospedero, las condiciones del medio ambiente o las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* (Zingales, 2018). Estas hipótesis han sido evaluadas mediante el aislamiento y/o caracterización de diversas cepas obtenidas en distintos países de Latinoamérica (Breniere, Waleckx, & Barnabe, 2016; Zingales, 2018). En México se han obtenido y caracterizado pocos aislados de *T. cruzi*, los cuales han sido obtenidos de humanos, triatomíneos y de algunos reservorios silvestres (Cruz-Reyes & Pickering-Lopez, 2006). Todos estos aislados pertenecen al DTU TcI y se ha observado que de acuerdo con el hospedero de donde han sido obtenidos, muestran variedad en cuanto a sus propiedades biológicas, aunque pertenezcan al mismo DTU. Durante varios años se pensó que TcI era el único linaje presente en nuestro país (Bosseno et al.); sin embargo, estudios realizados en heces de triatomíneos obtenidos en la parte occidental de México mostraron que *T. longipennis* se encuentra fuertemente colonizado no sólo por TcI, sino también por TcII (Bosseno et al., 2009). El análisis usando multilocus enzimático (MLEE) y amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) confirmaron la presencia de ambos linajes TcI y TcII en México (Bosseno et al., 2002; Bosseno et al., 2009; Sanchez-Guillen et al., 2006). Asimismo, el análisis de genes del mini-exón, el espacio-

dor intergénico del mini-exón y RAPD confirmaron la presencia de TcI en nuestro país (Gomez-Hernandez et al., 2011; Ruiz-Sanchez et al., 2005). Posteriormente se identificó la presencia de otros DTUs, en donde las cepas TcI, TcII, TcIII, TcIV y TcV fueron encontradas en heces de triatomíneos capturados en el Estado de Veracruz (Ramos-Ligonio, Torres-Montero, Lopez-Monteon, & Dumonteil, 2012). La presencia de TcI, TcII y posiblemente de TcIII y TcIV se encontró en *Meccus pallidipennis* y *Triatoma barberi* capturados en el estado de Michoacán, y la presencia de TcI en *Triatoma dimidiata* en la península de Yucatán (Ibanez-Cervantes et al., 2013). Finalmente, en trabajos recientes se encontró la presencia de TcI y TcIV en *T. dimidiata* capturados en Quintana Roo (Dorn et al., 2017) y TcI y TcVI en dos haplotipos de *T. dimidiata* capturados en Chiapas (Pech-May et al., 2019). Estos trabajos muestran que los seis DTUs de *T. cruzi* están presentes en México, aunque TcI es claramente predominante.

Se ha propuesto que los cuadros clínicos, el diagnóstico y la respuesta de los pacientes al tratamiento específico, pueden estar influenciados por las diferencias biológicas entre las cepas de *T. cruzi* circulantes en una determinada área geográfica, así como por las diferencias genéticas entre las poblaciones humanas susceptibles (Zingales, 2018). Se ha reportado que, en la mayor parte de los casos de la ECH, la fase aguda sintomática está dada por cepas pertenecientes a TcI, y menos frecuentemente por TcII, TcIII y TcIV (Coura, 2007; Zingales et al., 2012). Además, se sabe que la mortalidad y morbilidad de los individuos infectados con *T. cruzi* depende de la carga parasitaria y del genotipo del parásito con el que se ha infectado. Durante la fase crónica sintomática, en algunos casos se determinó una posible relación entre el genotipo y el tipo de manifestación clínica, en donde las cepas

TcI se han relacionado a la CCC y a casos severos de meningoencefalitis en individuos inmunocomprometidos. En regiones donde se ha detectado la presencia de TcII, TcV y TcVI (región del cono Sur) se han presentado casos de Cardiomiopatía Chagásica severa y algunos casos muy desarrollados de megaesófago y megacolon. Por otro lado, TcIII pareciera no estar implicado en infecciones crónicas, y solamente se han reportado algunos casos donde TcIV se relaciona con las manifestaciones clínicas que presenta TcI, aunque esto aún no ha podido ser del todo comprobado (Burgos et al., 2008; Freitas, Lages-Silva, Crema, Pena, & Macedo, 2005; Lages-Silva et al., 2006; A. Luquetti et al., 1986; Zingales, 2018; Zingales et al., 2012).

Métodos

Llevamos a cabo una búsqueda en PubMed y la revisión bibliográfica cualitativa y sistemática de artículos relacionados con la identificación de moléculas antigénicas con potencial diagnóstico para la detección de la infección con *T. cruzi*. También, se llevó a cabo la revisión de artículos relacionados con las generalidades de la ECH y su diagnóstico, *T. cruzi* y cepas del parásito; así como, la revisión en páginas oficiales de la OMS y Organización Panamericana de la Salud (OPS) en lo referente a la ECH y guías para su diagnóstico.

Resultados

El diagnóstico de la ECH debe incluir el conjunto de datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio (OPS, 2020). Las pruebas de laboratorio se basan en la utilización de técnicas directas (observación del parásito en sangre, detección de su ADN por PCR o su aislamiento) o indirectas (determinando la presencia de anticuerpos específicos contra *T. cruzi*), cuya elección depende de la fase clínica de

la ECH, así como de la especificidad y sensibilidad de la prueba (CENAPRECE, 2015; Gomes, Lorena, & Luquetti, 2009; OPS-OMS, 2018; OPS, 2020; Salazar Schettino, Bucio Torres, Rojo Mdina, & Manuel Valencia, 2019).

En la fase aguda, en donde los parásitos se detectan durante los primeros 30 días después del inicio de los síntomas, el diagnóstico se dirige a la determinación de la presencia del parásito por examen microscópico de sangre en frotis o gota gruesa. En el caso de una parasitemia baja, se utiliza la concentración de la muestra por las técnicas de strout, microstrout y microhematocrito. La presencia del parásito también puede determinarse en la fase aguda de manera indirecta, detectando anticuerpos de tipo IgM contra *T. cruzi*, aunque la interpretación del resultado debe ser cuidadosa debido a la posible reacción cruzada con el factor reumatoide (WHO, 2007).

Las técnicas moleculares pueden ser útiles tanto en la fase aguda como en la crónica, cuando la carga parasitaria o los títulos de anticuerpos son muy bajos y no pueden ser detectados por otras técnicas, o cuando se requiere de una prueba confirmatoria. Para ello se utiliza la técnica de PCR, usando iniciadores específicos de secuencias del ADN del parásito. Esta prueba puede ser cualitativa, utilizándose en el examen confirmatorio en inmunodeprimidos y menores de 9 meses. También puede ser cuantitativa, permitiendo medir la carga parasitaria circulante en inmunodeprimidos, donantes de órganos que tienen niveles de CD4 bajos, en infección congénita o durante el seguimiento postratamiento (Salazar Schettino et al., 2019).

En la fase crónica, el diagnóstico se basa en la historia clínica complementada con estudios de gabinete como radiología torácico-abdominal, electrocardiograma y/o ecocardiograma de doce

derivaciones y ultrasonido, junto con pruebas serológicas para detectar anticuerpos anti-*T. cruzi*. En esta fase, la presencia del parásito es escasa y hay anticuerpos circulantes contra el parásito, por lo que el método serológico es el más utilizado detectando la presencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en más del 98% de los individuos infectados. Los métodos más comunes y disponibles comercialmente son la inmunofluorescencia indirecta (IFI), la hemaglutinación indirecta (HI) y el ensayo inmuno-absorbente ligado a enzima (ELISA). Otras técnicas menos utilizadas son el *Western blot* (WB) con antígeno de excreción-secreción de epimastigotes (ESEA) o tripomastigotes (TESA), el ensayo inmunoenzimático en micro-gotas sobre nitrocelulosa (Dot-ELISA), la detección del ADN de *T. cruzi* por PCR, y el aislamiento del parásito en medio de cultivo, en triatominos (xenodiagnóstico) o en ratones de laboratorio. Estos últimos exámenes, regularmente no están disponibles comercialmente y dan resultados positivos en menos del 50% de los individuos en fase crónica, por lo que están indicados sólo para determinadas situaciones, como en los casos de serología dudosa o durante el seguimiento postratamiento con drogas tripanocidas (Avila et al., 1993; Diez, Manattini, Zanuttini, Bottasso, & Marcipar, 2008; Dumonteil, 1999; Gomes et al., 2009; Rassi, Rassi, & Little, 2000; Salazar Schettino et al., 2019; WHO, 2007).

Las diferentes pruebas serodiagnósticas para la fase crónica de la ECH presentan niveles variables de sensibilidad y especificidad, no habiendo hasta el momento una prueba estándar de oro para un diagnóstico 100% confiable (Zingales, 2018). Por ello, la OMS recomienda la combinación de una prueba de alta sensibilidad (como IFI o ELISA con extractos totales) y una de alta especificidad (como HI o ELISA, usando anti-

genos recombinantes) corridas en paralelo para un mejor diagnóstico. Además, se recomienda realizar una tercera prueba serológica para reducir el nivel de resultados indeterminados que producen las dos pruebas iniciales, a niveles de menos del 2%. Se ha observado que cuando menos la mitad de las muestras con resultados no concluyentes tienen reacción cruzada con infecciones con *Leishmania* (principalmente la forma visceral), provienen de pacientes chagásicos que han recibido tratamiento con drogas tripanocidas o son de recién nacidos con anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*, adquiridos por transmisión pasiva de sus madres infectadas. Por ello, es importante determinar si la zona de donde proviene la muestra es también endémica de Leishmaniasis, y en el caso de infectados que están siendo tratados, se recomienda aplicar tantas pruebas como sea necesario para llegar a un diagnóstico confiable de sero-negativización indicativo de curación, en comparación con las muestras de suero positivas tomadas antes del tratamiento. En el caso de la infección congénita en que se ha demostrado que la madre es positiva a la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi*, es necesaria la búsqueda de parásitos en la sangre del recién nacido o la detección de anticuerpos IgG después de seis meses del nacimiento, garantizando así que los anticuerpos no son de la madre y entonces poder proporcionar un diagnóstico correcto y un tratamiento oportuno al recién nacido. Para el caso de estudios seroepidemiológicos, se recomienda el uso de pruebas con alta sensibilidad, tales como IFI o ELISA. Finalmente, en caso de resultados no concluyentes, se recomienda que las muestras de suero se envíen a laboratorios especializados de referencia (Salazar Schettino et al., 2019; WHO, 2007).

En México, el diagnóstico de la ECH se rige por un algoritmo de pruebas parasitológicas básicas y tres pruebas serológicas para la confir-

mación de los casos agudos y crónicos en el país. Esto es regulado por el Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (InDRE), que es el Laboratorio Nacional de Referencia (Salazar Schettino et al., 2019). De inicio el diagnóstico se establece considerando criterios clínicos y epidemiológicos que, tras la correcta selección del material biológico de acuerdo con la fase clínica de la enfermedad, se confirma o descarta en el laboratorio. En la fase aguda, se demuestra la presencia del parásito en sangre por frotis, gota gruesa o examen directo en sangre fresca (80%-90% de sensibilidad), que en caso necesario se puede concentrar la muestra (strout, microstrout y microhematocrito) para una mayor sensibilidad (90%-100%), pudiéndose realizar el diagnóstico a nivel local, estatal o federal. Para la fase crónica, la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi* se realiza después de la cuarta semana de la infección, considerando que el nivel máximo de anticuerpos se alcanza a las doce semanas. Se utilizan dos pruebas serológicas de inicio, una de alta sensibilidad con antígenos totales y una de alta especificidad con antígenos recombinantes (ELISA con Ag crudos, ELISA con Ag recombinantes o HAI con 98%-99.5% de certeza diagnóstica), que cuando arrojan resultados discrepantes se realiza una tercera prueba diferente (IFI). Si se continua obteniendo un resultado discrepante, se repite el procedimiento con una nueva muestra (Salazar Schettino et al., 2019).

El InDRE, en coordinación con el Centro Nacional de Transfusión Sanguínea (CNTS), también regula la obligatoriedad del tamizaje a donadores de sangre, como parte del programa de Acción para la Prevención y Control de la ECH en México, tras su incorporación en la iniciativa de los Países de Centro América y México (IPCAM) en el 2012. De acuerdo con lo dispuesto en la NOM-253-SSA1-2012, se realiza el tamizaje de *T. cruzi* (usando el mismo al-

goritmo serológico descrito anteriormente) a todos los donadores de sangre, alcanzando una cobertura del total de los bancos de sangre del país a partir del 2016. De esta manera, se eliminan las unidades de sangre reactivas a *T. cruzi*, evitando la transmisión del parásito por la vía transfusional y se realiza la notificación correspondiente a nivel hospital, jurisdicción sanitaria y a nivel estatal (epidemiología y vectores) para el estudio y seguimiento de los donadores infectados (Salazar Schettino et al., 2019). El tamizaje también debe ser realizado a toda mujer embarazada con antecedentes de riesgo como: el nacer o vivir en zonas endémicas, cuando exista la presencia del vector en el domicilio o cuando se tienen antecedentes de haber recibido transfusión sanguínea o trasplante de órganos, pudiéndose aplicar el tamizaje en cualquier momento de la gestación. En caso de que el diagnóstico resulte positivo en la madre, se realiza la búsqueda del parásito por algún micrométodo en sangre del cordón umbilical o en sangre periférica del recién nacido a los siete días de su nacimiento. Si el resultado es negativo, el micrométodo se repite al primer mes del nacimiento y si es negativo nuevamente, se realizan pruebas serológicas de los 6 a los 10 meses de edad. De confirmarse la infección connatal con *T. cruzi*, se inicia el tratamiento inmediatamente, verificando su efectividad periódicamente cada 6 meses, hasta la seronegativización (Salazar Schettino et al., 2019).

Las pruebas serodiagnósticas convencionales utilizan antígenos del parásito completo, los cuales tienen la desventaja de presentar reacciones inespecíficas debido a la reacción cruzada que pueden tener con otros patógenos como *Leishmania* spp. y *T. rangeli*. Por ello, se utilizan también las pruebas no convencionales que, para aumentar su especificidad, utilizan antígenos recombinantes o péptidos sintéticos (Zingales, 2018). Estas tecno-

logías no convencionales han permitido un claro avance en términos de aumento de su especificidad, identificándose y analizándose varias moléculas antigénicas. En años anteriores, se han reportado dos análisis y la revisión sistemática de varios de estos posibles antígenos con potencial diagnóstico, mostrando que tienen diferente rango de sensibilidad y especificidad, así como un uso potencial principalmente para el diagnóstico de la infección crónica de la ECH, aunque algunos de ellos también han sido probados para el diagnóstico de la infección aguda y congénita, o para el monitoreo postratamiento (da Silveira, Umezawa, & Luquetti, 2001; Marcipar & Lagier, 2012). Estos análisis han permitido evidenciar la necesidad de usar cocteles de antígenos recombinantes, mezclas de péptidos sintéticos o antígenos multiepitope para aumentar la sensibilidad de las pruebas, ya que los antígenos individuales han mostrado que carecen de la sensibilidad requerida en comparación con las pruebas convencionales (da Silveira et al., 2001). También, se ha propuesto que es necesario el uso de paneles de sueros de referencia internacionales, para una adecuada comparación de la efectividad de dichos antígenos (Marcipar & Lagier, 2012). A partir de estos trabajos, la identificación y análisis de proteínas recombinantes, péptidos sintéticos y proteínas quiméricas ha seguido en aumento, reportándose varias secuencias con posible potencial diagnóstico. Se ha evaluado la utilidad de estos posibles antígenos para detectar la infección aguda y/o crónica de la ECH (Bivona et al., 2018; Caeiro et al., 2018; Kim et al., 2019; Mendes et al., 2013; Montalvao et al., 2018; Peverengo et al., 2018; Portillo et al., 2019; Reis-Cunha et al., 2014; Santos et al., 2017; Thomas et al., 2012), para dar seguimiento de la eficiencia del tratamiento antiparasitario (Balouz et al., 2017; Caeiro et al., 2018; Egui et al., 2019; Floridia-Yapur et al., 2019; Montalvao et al., 2018; Peverengo et al., 2018; Portillo et al., 2019; Reis-Cunha et al.,

2014; Santos et al., 2017; Thomas et al., 2012) y para identificar la infección con un DTU de *T. cruzi* en particular (Mendes et al., 2013; Thomas et al., 2012), mostrando en algunos casos tener una mejor sensibilidad (Duthie et al., 2016) y en otros una especificidad variable (Del-Rei et al., 2019). En algunos de estos trabajos se han utilizado los nuevos enfoques de secuenciación de alto rendimiento y cobertura a gran escala, es decir, cubriendo el genoma completo o gran parte del genoma, para la identificación de epítomos (Mendes et al., 2013; Reis-Cunha et al., 2014), mostrando así la gran utilidad de estas nuevas tecnologías en la identificación de antígenos con potencial diagnóstico.

Los antígenos de *T. cruzi* se relacionan con el DTU al que pertenece la cepa del parásito. Por ejemplo, se han identificado dos antígenos de superficie en tripomastigotes denominados TSSAI y TSSAII (*Trypomastigote Small Surface Antigen*) que se expresan diferencialmente en los distintos DTUs. Mientras que los parásitos pertenecientes a TcI, TcIII y TcIV tienen el alelo que codifica para TSSAI, las cepas TcII, TcV y TcVI expresan el alelo codificante para TSSAII (Bhattacharyya et al., 2010; Di Noia, Buscaglia, De Marchi, Almeida, & Frasch, 2002) no teniendo reacción cruzada entre ellos en los ensayos serológicos, lo que permite un diagnóstico diferencial. Por lo tanto se ha propuesto a TSSA como posible marcador inmunológico de los linajes genéticos de *T. cruzi* y con potencial pronóstico en el desarrollo de CCC o megasíndromes, ya que como se mencionó anteriormente hay una correlación del tipo de órganos afectados y los diferentes DTUs (Di Noia et al., 2002; Zingales et al., 2012). Debido a la variabilidad antigénica, genética, fenotípica y geográfica de las cepas de *T. cruzi*, es de esperar que exista una variación en la respuesta de anticuerpos del hospedero, así como variaciones regionales en la sensibilidad de las pruebas

serológicas (Zingales, 2018; Zingales et al., 2012). En diversos trabajos se ha observado que el uso de antígenos provenientes de cepas de distinto origen geográfico al de los sueros de individuos infectados, muestra una variación en los resultados obtenidos en el diagnóstico. En un trabajo utilizando dos pruebas, una inmunocromatográfica comercial (Chagas Stat-Pak) y otra por ELISA usando antígenos recombinantes, se evaluaron 2,484 muestras serológicas (995 de sujetos de una población rural de todas las edades en el sur de Bolivia, 459 de mujeres embarazadas de la misma población y 1030 de mujeres de población urbana que dieron a luz), encontrando diferencias significativas en la discordancia entre ambas pruebas según la edad y el origen geográfico, que en el caso particular de las mujeres embarazadas estas diferencias fueron alarmantes (Chippaux et al., 2009). También, usado la misma prueba Chagas Stat-Pak y la prueba rápida InBios con sueros positivos y negativos a *T. cruzi* provenientes de Bolivia y Perú, se determinó una sensibilidad inadecuada para las muestras de Bolivia (87.5% y 90.7% respectivamente) y niveles aún más bajos de sensibilidad para las muestras provenientes de Perú (26.6-33.0% y 54.4-55.2% respectivamente), atribuyéndose estas diferencias y la baja eficiencia de detección a las distintas cepas del parásito de cada zona (Verani et al., 2009). Estos resultados contrastan con los obtenidos utilizando la prueba Chagas Stat-Pak con sueros provenientes de Brasil, Honduras, Venezuela, Bolivia y Argentina (Luquetti et al., 2003) así como de El Salvador y Nicaragua (Ponce et al., 2005), en que se obtuvieron altos niveles de sensibilidad y especificidad en todos los casos. Evidencia adicional fue obtenida en otro estudio en que se evaluó por ELISA un panel de 541 muestras de suero de pacientes chagásicos y no chagásicos de nueve países de América Latina (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, El Salvador, Guatemala, Honduras y Venezuela) con 6

antígenos recombinantes (H49, JL7, A13, B13, JL8 y 1F8) que incluyen a los tres presentes en la prueba Chagas Stat-Pak (H49, B13 y 1F8). En este estudio, también se encontró una posible asociación entre el patrón de reactividad de los antígenos recombinantes y el origen geográfico de las muestras de suero (Umezawa et al., 2003). Estas mismas observaciones se han obtenido en México, en donde en un trabajo realizado en el Estado de Puebla se detectaron niveles mayores de anticuerpos cuando se usa como antígeno proteínas de extractos totales de cepas de *T. cruzi* autóctonas, en contraste con los bajos niveles de anticuerpos obtenidos cuando se utiliza un antígeno comercial de cepas de parásito de otros países endémicos (Chagastest-Wiener Laboratories Group, Rosario, Argentina) (Perez-Fuentes et al., 1998). También, en el Estado de Veracruz se observaron grandes discordancias en los resultados serológicos a *T. cruzi*, utilizando cinco diferentes ensayos de ELISA (dos caseros y tres comerciales). Aun cuando el lisado de los parásitos obtenidos de la misma región mostró una mejor sensibilidad que las pruebas comerciales, ésta no fue lo suficientemente alta sugiriendo la falta de un repertorio de proteínas antigénicas en el lisado, que cubriera toda la diversidad de los parásitos del lugar de estudio (Guzman-Gomez et al., 2015). Dicha hipótesis es factible, considerando que en el estado de Veracruz se han identificado a 5 diferentes DTUs (TcI, TcII, TcIII, TcIV y TcV) en heces de triatominos capturados en el ciclo doméstico (Ramos-Ligonio et al., 2012).

Conclusiones

Un diagnóstico temprano y confiable es determinante para la aplicación de un tratamiento oportuno que asegure un mejor pronóstico en un paciente chagásico, como en cualquier otra infección. Los métodos de serodiagnóstico hasta ahora disponibles para la etapa crónica de la ECH

aún presentan niveles variables de especificidad y sensibilidad, sin contar hasta el momento con una prueba estándar de oro para un diagnóstico totalmente confiable y que permita disminuir los altos costos que representa actualmente la necesidad de aplicar más de una prueba serodiagnóstica. Es importante también, incorporar en este esquema pruebas serodiagnósticas que sean capaces de reconocer antígenos del parásito provenientes de cualquier DTU presentes en los diferentes países endémicos. En este sentido, si bien es cierto que diversas cepas del parásito han sido aisladas y caracterizadas al parecer éstas no son suficientes, ya que las pruebas comerciales hasta ahora disponibles aún muestran resultados discrepantes con los sueros de individuos infectados de los diferentes países endémicos. Esto muestra, la necesidad de aislar y caracterizar un mayor número de cepas del parásito provenientes de las distintas regiones endémicas de Latinoamérica, e identificar un repertorio de proteínas antigénicas que cubra la mayor parte y de ser posible el total de la diversidad de parásitos presentes en los países endémicos. La búsqueda de mejores biomarcadores de la infección con *T. cruzi* siguen siendo un reto y diversas metodologías pueden ser utilizadas para su identificación. La integración de las nuevas estrategias de proteómica, sin duda permite el estudio a gran escala de las proteínas de un organismo, que se puede incluso llevar a nivel de diferentes cepas, obteniendo una visión global, integrada, cuantitativa y comparativa de su proteoma (Pitarch, Nombela, & Gil, 2010). Estas estrategias acopladas a inmunoensayos (*Western blot* e inmunoprecipitación) para la identificación de proteínas antigénicas, conservadas y/o inmunodominantes, así como al análisis de inmunogenómica para la tipificación de epitopes lineales conservados de células B (Elisei et al., 2018), podrían permitir la identificación de mejores antígenos para el desarrollo de

una prueba estándar sensible y específica, útil en la detección de la infección con cualquiera de las cepas de *T. cruzi*. Finalmente, ya que se ha mostrado que los antígenos individuales no presentan la sensibilidad necesaria, al igual que en otros trabajos, resaltamos la importancia del uso de cocteles de antígenos recombinantes, mezclas de péptidos sintéticos o de antígenos multiepitope para una óptima sensibilidad y especificidad de las pruebas, así como el uso de paneles de sueros de referencia internacionales para la evaluación de su efectividad.

Bibliografía

- Arnal, A., Waleckx, E., Rico-Chavez, O., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2019). Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(4), e0006859. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30964871>. doi:10.1371/journal.pntd.0006859
- Avila, H. A., Pereira, J. B., Thiemann, O., De Paiva, E., DeGrave, W., Morel, C. M., & Simpson, L. (1993). Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, *31*(9), 2421-2426. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8408566>.
- Balouz, V., Melli, L. J., Volcovich, R., Moscatelli, G., Moroni, S., Gonzalez, N., . . . Altchek, J. (2017). The Trypomastigote Small Surface Antigen from *Trypanosoma cruzi* Improves Treatment Evaluation and Diagnosis in Pediatric Chagas Disease. *Journal of Clinical Microbiology*, *55*(12), 3444-3453. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28978686>. doi:10.1128/JCM.01317-17
- Bhattacharyya, T., Brooks, J., Yeo, M., Carrasco, H. J., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., & Miles, M. A. (2010). Analysis of molecular diversity of the *Trypanosoma cruzi* trypomastigote small surface antigen reveals novel epitopes, evidence of positive selection and potential implications for lineage-specific serology. *International Journal for Parasitology*, *40*(8), 921-928. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20097201>. doi:10.1016/j.ijpara.2010.01.002
- Bivona, A. E., Sanchez Alberti, A., Matos, M. N., Cerny, N., Cardoso, A. C., Morales, C., . . . Malchiodi, E. L. (2018). *Trypanosoma cruzi* 80 kDa prolyl oligopeptidase (Tc80) as a novel immunogen for Chagas disease vaccine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(3), e0006384. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29601585>. doi:10.1371/journal.pntd.0006384
- Bosseno, M. F., Barnabe, C., Magallon Gastelum, E., Lozano Kasten, F., Ramsey, J., Espinoza, B., & Breniere, S. F. (2002). Predominance of *Trypanosoma cruzi* lineage I in Mexico. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(2), 627-632. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11825982>.

- Bosseno, M. F., Barnabe, C., Sierra, M. J., Kengne, P., Guerrero, S., Lozano, F., . . . Breniere, S. F. (2009). Wild ecotopes and food habits of *Triatoma longipennis* infected by *Trypanosoma cruzi* lineages I and II in Mexico. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *80*(6), 988-991. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19478263>.
- Breniere, S. F., Waleckx, E., & Barnabe, C. (2016). Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *10*(8), e0004792. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27571035>. doi:10.1371/journal.pntd.0004792
- Briones, M. R., Souto, R. P., Stolf, B. S., & Zingales, B. (1999). The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *104*(2), 219-232. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10593177>.
- Burgos, J. M., Begher, S., Silva, H. M., Bisio, M., Duffy, T., Levin, M. J., . . . Schijman, A. G. (2008). Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* I tropism for central nervous system in Chagas reactivation due to AIDS. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *78*(2), 294-297. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256432>.
- Caeiro, L. D., Alba-Soto, C. D., Rizzi, M., Solana, M. E., Rodriguez, G., Chidichimo, A. M., . . . Tekiel, V. (2018). The protein family TcTASV-C is a novel *Trypanosoma cruzi* virulence factor secreted in extracellular vesicles by trypomastigotes and highly expressed in bloodstream forms. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *12*(5), e0006475. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29727453>. doi:10.1371/journal.pntd.0006475
- CENAPRECE. (2015). Manual de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/235962/ManualDX_TxEnfermedadCHAGAS2015.pdf
- Chippaux, J. P., Santalla, J. A., Postigo, J. R., Romero, M., Salas Clavijo, N. A., Schneider, D., & Brutus, L. (2009). Sensitivity and specificity of Chagas Stat-Pak test in Bolivia. *Tropical Medicine and International Health*, *14*(7), 732-735. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19392737>. doi:10.1111/j.1365-3156.2009.02288.x

- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *102 Suppl 1*, 113-122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17992371>.
- Coura, J. R., & Borges-Pereira, J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica*, *115*(1-2), 5-13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382097>. doi:10.1016/j.actatropica.2010.03.008
- Cruz-Reyes, A., & Pickering-Lopez, J. M. (2006). Chagas disease in Mexico: an analysis of geographical distribution during the past 76 years--a review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *101*(4), 345-354. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951802>.
- da Silveira, J. F., Umezawa, E. S., & Luquetti, A. O. (2001). Chagas disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. *Trends in Parasitology*, *17*(6), 286-291. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11378036>.
- Del-Rei, R. P., Leony, L. M., Celedon, P. A. F., Zanchin, N. I. T., Reis, M. G. D., Gomes, Y. M., . . . Santos, F. L. N. (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. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30998741>. doi:10.1371/journal.pone.0215623
- Di Noia, J. M., Buscaglia, C. A., De Marchi, C. R., Almeida, I. C., & Frasch, A. C. (2002). A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. *Journal of Experimental Medicine*, *195*(4), 401-413. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11854354>.
- Diez, C. N., Manattini, S., Zanuttini, J. C., Bottasso, O., & Marcipar, I. (2008). The value of molecular studies for the diagnosis of congenital Chagas disease in northeastern Argentina. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *78*(4), 624-627. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385359>.
- Dorn, P. L., McClure, A. G., Gallaspy, M. D., Waleckx, E., Woods, A. S., Monroy, M. C., & Stevens, L. (2017). The diversity of the Chagas parasite, *Trypanosoma cruzi*, infecting the main Central American vector, *Triatoma dimidiata*, from Mexico to Colombia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(9), e0005878. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28957315>. doi:10.1371/journal.pntd.0005878

- Dumonteil, E. (1999). Update on Chagas' disease in Mexico. *Salud Publica de México*, 41(4), 322-327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10624144>.
- Duthie, M. S., Guderian, J. A., Vallur, A. C., Misquith, A., Liang, H., Mohamath, R., . . . Reed, S. G. (2016). Multi-epitope proteins for improved serological detection of *Trypanosoma cruzi* infection and Chagas Disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 84(3), 191-196. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26658314>. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2015.11.006
- Egui, A., Thomas, M. C., Fernandez-Villegas, A., Perez-Anton, E., Gomez, I., Carriero, B., . . . Lopez, M. C. (2019). A Parasite Biomarker Set for Evaluating Benznidazole Treatment Efficacy in Patients with Chronic Asymptomatic *Trypanosoma cruzi* Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(10). Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31358581>. doi:10.1128/AAC.02436-18
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., . . . Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*, 309(5733), 409-415. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16020725>. doi:10.1126/science.1112631
- Elisei, R. M. T., Matos, C. S., Carvalho, A., Chaves, A. T., Medeiros, F. A. C., Barbosa, R., . . . Menezes-Souza, D. (2018). Immunogenomic screening approach to identify new antigens for the serological diagnosis of chronic Chagas' disease. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29736822>. doi:10.1007/s00253-018-8992-7
- Espinoza Gutierrez, B., & Manning Cela, R. G. (2008). An overview of mammalian cell infection by *Trypanosoma cruzi*: Cellular and molecular basis. In L. I. Terrazas (Ed.), *Advances in the immunobiology of parasitic diseases*. Kerala, India. : Research Signpost.
- Florida-Yapur, N., Monje-Rumi, M., Ragone, P., Lauthier, J. J., Tomasini, N., Alberti D'Amato, A., . . . Tekiel, V. (2019). TcTASV Antigens of *Trypanosoma cruzi*: Utility for Diagnosis and High Accuracy as Biomarkers of Treatment Efficacy in Pediatric Patients. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 101(5), 1135-1138. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31516110>. doi:10.4269/ajtmh.18-0936
- 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. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777917>. doi:10.1016/j.ijpara.2004.10.023

- Galvão, C., Carcavallo, R., Rocha-Da Silva, D., & Jurberg, J. (2003). A checklist of the current valid species of the subfamily Triatiominae Jeannel, 1919 (Hemiptera: Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa*, 202, 1-36.
- Gomes, Y. M., Lorena, V. M., & Luquetti, A. O. (2009). Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 115-121. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753466>.
- Gomez-Hernandez, C., Rezende-Oliveira, K., Nascentes, G. A., Batista, L. R., Kappel, H. B., Martinez-Ibarra, J. A., . . . Ramirez, L. E. (2011). Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* Mexican strains and their behavior in the mouse experimental model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 44(6), 684-690. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094706>.
- Guzman-Bracho, C. (2001). Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. *Trends in Parasitology*, 17(8), 372-376. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11685897>.
- Guzman-Gomez, D., Lopez-Monteon, A., de la Soledad Lagunes-Castro, M., Alvarez-Martinez, C., Hernandez-Lutzon, M. J., Dumonteil, E., & Ramos-Ligonio, A. (2015). Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasites & Vectors*, 8, 466. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384317>. doi:10.1186/s13071-015-1072-2
- Henriksson, J., Dujardin, J. C., Barnabe, C., Brisse, S., Timperman, G., Venegas, J., . . . Solari, A. (2002). Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. *Parasitology*, 124(Pt 3), 277-286. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922429>.
- Ibanez-Cervantes, G., Martinez-Ibarra, A., Noguera-Torres, B., Lopez-Orduña, E., Alonso, A. L., Perea, C., . . . Leon-Avila, G. (2013). Identification by Q-PCR of *Trypanosoma cruzi* lineage and determination of blood meal sources in triatomine gut samples in Mexico. *Parasitology International*, 62(1), 36-43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22995149>. doi:10.1016/j.parint.2012.09.003
- Justi, S. A., & Galvao, C. (2017). The Evolutionary Origin of Diversity in Chagas Disease Vectors. *Trends in Parasitology*, 33(1), 42-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27986547>. doi:10.1016/j.pt.2016.11.002
- Kim, Y. H., Yang, Z., Lee, J., Ahn, H. J., Chong, C. K., Maricondi, W., . . . Nam, H. W. (2019). Detection of Human Anti-*Trypanosoma cruzi* Antibody with

- Recombinant Fragmented Ribosomal P Protein. *Korean Journal of Parasitology*, 57(4), 435-437. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31533412>. doi:10.3347/kjp.2019.57.4.435
- Lages-Silva, E., Ramirez, L. E., Pedrosa, A. L., Crema, E., da Cunha Galvao, L. M., Pena, S. D., . . . Chiari, E. (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2167-2171. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16757616>. doi:10.1128/JCM.02124-05
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(4), 342-348. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395248>. doi:10.1016/S1473-3099(13)70002-1
- Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Gaunt, M. W., Yeo, M., Carrasco, H. J., & Miles, M. A. (2009). Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in *Trypanosoma cruzi* populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1305-1317. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19393242>. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.001
- Luquetti, Ponce, C., Ponce, E., Esfandiari, J., Schijman, A., Revollo, 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. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12944018>. doi:10.1016/s0732-8893(03)00051-8
- Luquetti, A., Miles, M., Rassi, A., de Rezende, J., de Souza, A., Póvoa, M., & Rodrigues, I. (1986). *Trypanosoma cruzi*: zimodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80, 462-470.
- Marcipar, I. S., & Lagier, C. M. (2012). Advances in Serological Diagnosis of Chagas' Disease by Using Recombinant Proteins. In A. J. Rodriguez-Morales (Ed.), *Current Topics in Tropical Medicine* (pp. 1-28): InTechOpen.
- Mendes, T. A., Reis Cunha, J. L., de Almeida Lourdes, R., Rodrigues Luiz, G. F., Lemos, L. D., dos Santos, A. R., . . . Bartholomeu, D. C. (2013). Identification of strain-specific B-cell epitopes in *Trypanosoma cruzi* using genome-scale epitope prediction and high-throughput immunoscreening with peptide arrays. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2524. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24205430>. doi:10.1371/journal.pntd.0002524

- Montalvao, F., Nascimento, D. O., Nunes, M. P., Koeller, C. M., Morrot, A., Lery, L. M. S., . . . Freire-de-Lima, C. G. (2018). Antibody Repertoires Identify beta-Tubulin as a Host Protective Parasite Antigen in Mice Infected With *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in Immunology*, 9, 671. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29706955>. doi:10.3389/fimmu.2018.00671
- OPS-OMS. (2018). Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Retrieved from https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275320433_spa.pdf?sequence=9&isAllowed=y
- OPS. (2020). *Enfermedad de Chagas*. Retrieved from <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- Pech-May, A., Mazariegos-Hidalgo, C. J., Izeta-Alberdi, A., Lopez-Cancino, S. A., Tun-Ku, E., De la Cruz-Felix, K., . . . Ramsey, J. M. (2019). Genetic variation and phylogeography of the *Triatoma dimidiata* complex evidence a potential center of origin and recent divergence of haplogroups having differential *Trypanosoma cruzi* and DTU infections. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13(1), e0007044. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30689662>. doi:10.1371/journal.pntd.0007044
- Pedroso, A., Cupolillo, E., & Zingales, B. (2003). Evaluation of *Trypanosoma cruzi* hybrid stocks based on chromosomal size variation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 129(1), 79-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12798509>.
- Perez-Fuentes, R., Sanchez-Guillen, M. C., Gonzalez-Alvarez, C., Monteon, V. M., Reyes, P. A., & Rosales-Encina, J. L. (1998). Humoral nitric oxide levels and antibody immune response of symptomatic and indeterminate Chagas' disease patients to commercial and autochthonous *Trypanosoma cruzi* antigen. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 58(6), 715-720. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9660451>.
- Peveengo, L. M., Garcia, V., Rodeles, L. M., Mendicino, D., Vicco, M., Lagier, C., . . . Marcipar, I. (2018). Development and assessment of an improved recombinant multiepitope antigen-based immunoassay to diagnose chronic Chagas disease. *Parasitology*, 145(12), 1594-1599. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29587896>. doi:10.1017/S0031182018000458
- Pitarch, A., Nombela, C., & Gil, C. (2010). [Proteomics, a new challenge for clinical microbiology]. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(8), 489-491. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20888998>. doi:10.1016/j.eimc.2010.08.001

- Ponce, C., Ponce, E., Vinelli, E., Montoya, A., de Aguilar, V., Gonzalez, A., . . . da Silveira, J. F. (2005). Validation of a rapid and reliable test for diagnosis of chagas' disease by detection of Trypanosoma cruzi-specific antibodies in blood of donors and patients in Central America. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(10), 5065-5068. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207963>. doi:10.1128/JCM.43.10.5065-5068.2005
- Portillo, S., Zepeda, B. G., Iniguez, E., Olivas, J. J., Karimi, N. H., Moreira, O. C., . . . Almeida, I. C. (2019). A prophylactic alpha-Gal-based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. *NPJ Vaccines*, 4, 13. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30911415>. doi:10.1038/s41541-019-0107-7
- Ramos-Ligonio, A., Torres-Montero, J., Lopez-Monteon, A., & Dumonteil, E. (2012). Extensive diversity of Trypanosoma cruzi discrete typing units circulating in Triatoma dimidiata from central Veracruz, Mexico. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(7), 1341-1343. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22569098>. doi:10.1016/j.meegid.2012.04.024
- Ramsey, J. M., Ordonez, R., Cruz-Celis, A., Alvear, A. L., Chavez, V., Lopez, R., . . . Carrillo, S. (2000). Distribution of domestic triatominae and stratification of Chagas Disease transmission in Oaxaca, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology*, 14(1), 19-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10759308>.
- Ramsey, J. M., Peterson, A. T., Carmona-Castro, O., Moo-Llanes, D. A., Nakazawa, Y., Butrick, M., . . . Ibarra-Cerdena, C. N. (2015). Atlas of Mexican Triatominae (Reduviidae: Hemiptera) and vector transmission of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(3), 339-352. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25993505>. doi:10.1590/0074-02760140404
- Ramsey, J. M., & Schofield, C. J. (2003). Control of Chagas disease vectors. *Salud Publica de México*, 45(2), 123-128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12736992>.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., & Little, W. C. (2000). Chagas' heart disease. *Clinical Cardiology*, 23(12), 883-889. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11129673>.
- Rassi, A., Jr., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet*, 375(9723), 1388-1402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20399979>. doi:10.1016/S0140-6736(10)60061-X
- Reis-Cunha, J. L., Mendes, T. A., de Almeida Lourdes, R., Ribeiro, D. R., Machado-de-Avila, R. A., de Oliveira Tavares, M., . . . Bartholomeu, D. C. (2014). Genome-wide screening and identification of new Trypanosoma cruzi antigens with potential application for chronic Chagas disease diagnosis. *PLoS One*, 9(9), e106304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

pubmed/25225853. doi:10.1371/journal.pone.0106304

- Ruiz-Sanchez, R., Leon, M. P., Matta, V., Reyes, P. A., Lopez, R., Jay, D., & Monteon, V. M. (2005). *Trypanosoma cruzi* isolates from Mexican and Guatemalan acute and chronic chagasic cardiopathy patients belong to *Trypanosoma cruzi* I. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *100*(3), 281-283. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16113869>. doi:/S0074-02762005000300012
- Salazar Schettino, P. M., Bucio Torres, M. I., Rojo Mdina, J., & Manuel Valencia, Y. V. (2019). Manual de procedimientos para la Enfermedad de Chagas en México. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/447946/Manual_de_Procedimientos_para_la_Enfermedad_de_Chagas_en_Mexico.pdf
- Sanchez-Guillen, M. C., Lopez-Colombo, A., Ordonez-Toquero, G., Gomez-Albino, I., Ramos-Jimenez, J., Torres-Rasgado, E., . . . Perez-Fuentes, R. (2006). Clinical forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, *101*(7), 733-740. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160280>.
- Santos, F. L., Celedon, P. A., Zanchin, N. I., de Souza, W. V., da Silva, E. D., Foti, L., . . . Gomes, Y. M. (2017). Accuracy of chimeric proteins in the serological diagnosis of chronic chagas disease - a Phase II study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(3), e0005433. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28273127>. doi:10.1371/journal.pntd.0005433
- Souza, R. T., Lima, F. M., Barros, R. M., Cortez, D. R., Santos, M. F., Cordero, E. M., . . . da Silveira, J. F. (2011). Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*, *6*(8), e23042. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21857989>. doi:10.1371/journal.pone.0023042
- Thomas, M. C., Fernandez-Villegas, A., Carrilero, B., Maranon, C., Saura, D., Noya, O., . . . Lopez, M. C. (2012). Characterization of an immunodominant antigenic epitope from *Trypanosoma cruzi* as a biomarker of chronic Chagas' disease pathology. *Clinical and Vaccine Immunology*, *19*(2), 167-173. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22155766>. doi:10.1128/CVI.05566-11
- Umezawa, E. S., Bastos, S. F., Coura, J. R., Levin, M. J., Gonzalez, A., Rangel-Aldao, R., . . . 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. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12519436>. doi:10.1046/j.1537-2995.2003.00279.x

- Vargas, N., Pedroso, A., & Zingales, B. (2004). Chromosomal polymorphism, gene synteny and genome size in *T. cruzi* I and *T. cruzi* II groups. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 138(1), 131-141. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15500924>. doi:10.1016/j.molbiopara.2004.08.005
- Verani, J. R., Seitz, A., Gilman, R. H., LaFuente, C., Galdos-Cardenas, G., Kawai, V., . . . Bern, C. (2009). Geographic variation in the sensitivity of recombinant antigen-based rapid tests for chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(3), 410-415. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19270291>.
- WHO. (2007). World Health Statistics. *World Health Organization*, 2, 21-31.
- WHO. (2020). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Retrieved from [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-tripanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-tripanosomiasis))
- Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28941731>. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., . . . Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 240-253. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22226704>. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009