

Diagnóstico de laboratorio de la infección humana por *Trypanosoma cruzi*

Desafíos en la región de las Américas

Laboratory diagnosis of Trypanosoma cruzi infection. Challenges in the Americas region

CONSTANZA LOPEZ ALBIZU^a, ROCÍO RIVERO^b, GRISELDA BALLERIN^c, MARGARITA M. C. BISIO^d

RESUMEN

La enfermedad de Chagas causada por *Trypanosoma cruzi*, endémica en 21 países, es un problema de salud pública para la región de las Américas. Se estima que dos terceras partes de las personas infectadas viven actualmente en zonas urbanas de todo el mundo y que solo el 10 % lo sabe. En este artículo, se resumen los aspectos más importantes del diagnóstico de la infección humana por *T. cruzi*. Se describen: las principales características del diagnóstico en el laboratorio clínico, desde la toma de muestra hasta su procesamiento; las pruebas disponibles más utilizadas en Latinoamérica y aquellas que se espera que con su implementación mejoren el acceso al diagnóstico de la población afectada; las ventajas, desventajas y sensi-

bilidad de las pruebas de diagnóstico; la utilidad de las mismas en las diferentes fases de la infección (aguda o crónica y en el contexto de la inmunosupresión). Se espera así contribuir a ampliar el conocimiento sobre esta infección prevalente en la Región de las Américas.

Palabras clave: *Enfermedad de Chagas, Diagnóstico, Trypanosoma cruzi, Técnicas de Laboratorio Clínico.*

ABSTRACT

Chagas disease, endemic in 21 countries, is a public health problem for the Americas region. It is estimated that two-thirds of people with *T. cruzi* infection currently live in urban areas and that only 10 % worldwide are aware of it. In this article, the most important aspects of the diagnosis of human *T. cruzi* infection are summarized. The main characteristics of clinical laboratory diagnosis are described, from sample collection to processing; the most widely used tests available in Latin America and those that are expected to improve access to diagnosis of the affected population with their implementation; the advantages, disadvantages and sensitivity of the tests in the different phases of infection; and their utility in acute or chronic phases and in the context of immunosuppression. In this way, it is hoped to contribute to broadening knowledge about this prevalent infection in the Region of the Americas.

Key words: *Chagas Disease, Diagnosis, Trypanosoma cruzi, Clinical Laboratory Techniques.*

INTRODUCCIÓN

El Trypanosoma cruzi, agente causal de la enfermedad de Chagas, pertenece al orden de los kinetoplastidos, un grupo ampliamente distribuido de protozoos que poseen 1 o 2 flagelos. La característica morfológica que los distingue es una

a. Mg. de la Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica, Bioquímica. Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben, ANLIS, Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina.

b. Dra. en Biología Molecular y Biotecnología, Lic. en Biodiversidad. Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina.

c. Bioquímica. Servicio de Parasitología y Enfermedad de Chagas, Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, Buenos Aires, Argentina

d. Dra. en Bioquímica, Bioquímica. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas; Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben, ANLIS Dr. Carlos G. Malbran, Buenos Aires, Argentina.

Correspondencia: marguieb@gmail.com

Conflicto de interés: ninguno que declarar.

Fuente de financiación: no se cuenta con financiación alguna para el presente trabajo.

estructura prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto que corresponde a una condensación de ADN (ADNk) localizado en el interior de una única mitocondria que está ramificada por toda la célula. Es un parásito con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados y que afronta una serie de situaciones y cambios importantes durante su interacción con las células del hospedero. Presenta tres estadios (epimastigote, tripomastigote y amastigote) que se definen en función de la morfología celular (esférica, piriforme o alargada) y la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior). El mamífero infectado por *T. cruzi* puede presentar parásitos en sangre (estadio tripomastigote, infectante extracelular) o en tejidos (estadio amastigote, replicativo intracelular) (Figura 1).

En el año 2009, en base a diferencias genéticas, fueron definidos dentro de la especie *T. cruzi* seis grupos diferentes o unidades discretas de tipificación (UDTs) (TcI a TcVI)¹ y recientemente se ha definido una nueva UDT hallada en murciélagos (TcBat).² Cada UDT puede incluir múltiples cepas de parásitos. En cuanto a la infección humana, la relación de las UDTs infectantes con la evolución de la infección y el desarrollo de manifestaciones clínicas específicas sigue siendo un tema de estudio.³

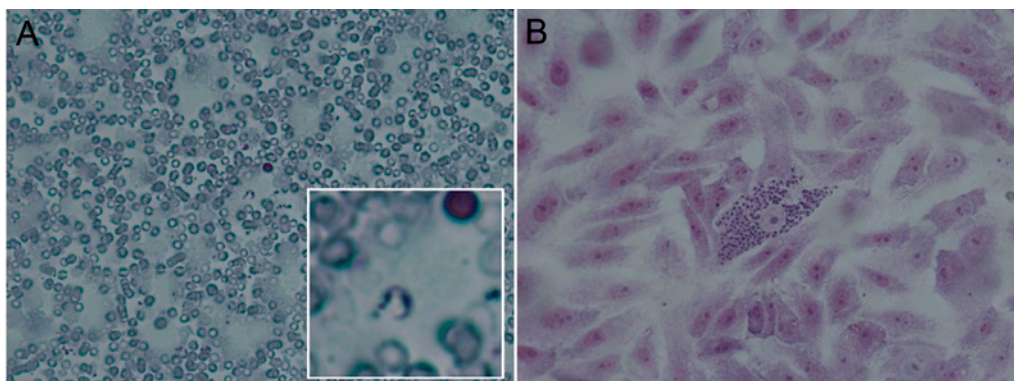
1.1. El desafío mundial de la infección por *T. cruzi* y su diagnóstico. También llamada tripanosomiasis americana, la enfermedad de Chagas pertenece, desde el año 2005, al grupo

de enfermedades infecciosas desatendidas. Se estima que 3 de cada 10 infectados desarrollan la enfermedad (patología cardíaca y/o digestiva). La infección, endémica en 21 países, es un problema de salud pública para la región de las Américas. Sin embargo, como consecuencia de las migraciones, la urbanización, la intensificación del turismo, la modificación de las estrategias agrícolas y el cambio climático, ha traspasado el marco rural y latinoamericano y ha logrado instalarse en países de América del Norte, Europa, Asia y Oceanía transformándose en un problema de salud pública global.⁴ Por lo que, el diagnóstico de laboratorio de esta infección debe ser tenido en cuenta tanto en zonas rurales como urbanas de todo el mundo.

1.2. Diagnóstico directo e indirecto en microbiología. Para diagnosticar enfermedades infecciosas es útil contar con métodos rápidos, precisos, sencillos y accesibles. El diagnóstico parasitológico puede ser abordado con diversas estrategias, ya sea realizando un diagnóstico directo (en el que se identifica el agente etiológico) o mediante un diagnóstico indirecto (en el cual se detectan los niveles de anticuerpos específicos contra antígenos del patógeno).⁵

La infección por *T. cruzi* cursa en dos fases: aguda y crónica. La fase aguda, que dura entre 3 y 4 meses desde el ingreso del parásito al hospedador, en el mayor porcentaje de pa-

Figura 1. Estadios de *T. cruzi* en los mamíferos. Tinción hematoxilina-eosina, observación a 400X.



A) Tripomastigote: alargado con el cinetoplasto localizado posteriormente al núcleo. Se encuentra en la sangre de los mamíferos y es la forma infectante. Esta forma no se divide y la caracteriza su movilidad.

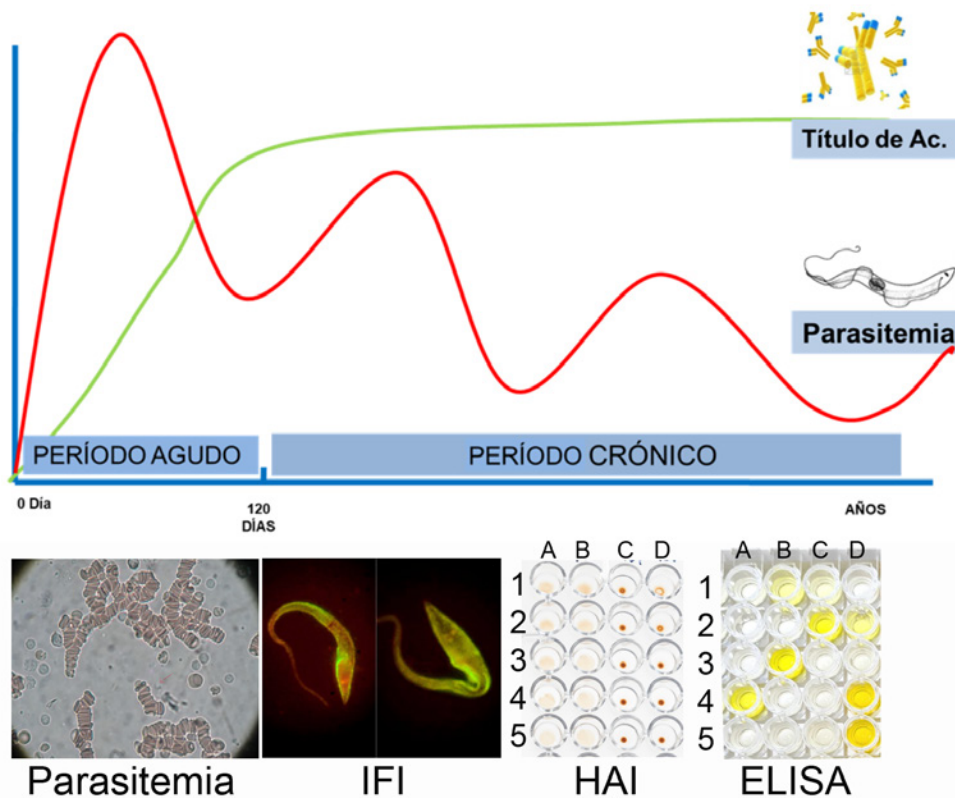
B) Nido de amastigotes: esféricos u ovalados, es la forma replicativa en el interior de las células mamíferas (principalmente en células musculares y nerviosas).

cientes, se presenta de manera asintomática y se caracteriza por una elevada carga de parásitos circulantes en sangre periférica. La fase crónica que comienza al disminuir la parasitemia se caracteriza por la presencia de anticuerpos IgG y cargas parasitarias bajas e intermitentes, detectables principalmente por métodos de amplificación.^{6,7} En este sentido, el curso natural de la infección determina si se debe utilizar un método de diagnóstico directo o indirecto (Figura 2).

1.3. Situación actual del diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. El diagnóstico preciso, rápido y oportuno de la infección por *T. cruzi* representa una estrategia fundamental en la lucha contra la enfermedad de Chagas ya que el tra-

tamiento temprano puede evitar las consecuencias para el sistema nervioso, digestivo o cardíaco a largo plazo.⁸ Además, en la infancia es efectivo y bien tolerado con escasas y leves reacciones adversas. En los últimos años, el número de pruebas de laboratorio existentes para el diagnóstico de infección por *T. cruzi*, la diversidad de tecnologías aplicadas, la escala de su uso y la heterogeneidad de algoritmos desarrollados en diferentes países han aumentado rápidamente. Sin embargo, si bien en la bibliografía han sido propuestas diferentes tecnologías y algoritmos, no han tenido un impacto real en términos de salud pública. En efecto, la cobertura en el diagnóstico de la infección sigue siendo deficiente en la Región de

Figura 2. Representación esquemática de parasitemia y anticuerpos específicos anti *T. cruzi* (título de Ac.) en sangre de pacientes infectados durante el curso natural de la infección. Se muestran, a modo de ejemplo, algunas pruebas de diagnóstico utilizadas en cada período de la infección.



Parasitemia: imagen microscópica al realizar la prueba del microhematocrito, en la misma no se observa el parásito sino que es ilustrativa de un preparado, ya que se realiza la búsqueda del mismo por observación de su movimiento. **IFI:** imagen microscópica de un preparado realizado con suero de una persona infectada. **HAI:** columnas A y B, se observan “mantos” producto de la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en el suero evaluado; columnas C y D: se observan “botones” producto de la ausencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en el suero evaluado. **ELISA:** imagen de una prueba de ELISA, se pueden observar los pocillos con resultados positivos en color amarillo y negativos sin coloración.

las Américas, y aunque creció en las últimas décadas no llega a los objetivos previstos.⁹⁻¹²

En este artículo, se resumen el estado actual en cuanto a la disponibilidad de pruebas de laboratorio para su aplicación clínica en el diagnóstico de la infección, así como los desarrollos recientes, proporcionando además una evaluación de sus ventajas e inconvenientes.

2. Diagnóstico parasitológico directo

Las pruebas parasitológicas cualitativas utilizadas habitualmente en el diagnóstico de laboratorio de la infección aguda permiten detectar el parásito o alguno de sus componentes. En este apartado se describen los métodos directos utilizados para el diagnóstico de la infección en humanos. En primer lugar, aquellos que buscan detectar el parásito utilizando microscopía (por la ventaja de una amplia disponibilidad del equipamiento requerido en los laboratorios clínicos y la obtención de un resultado inmediato) y luego aquellos que realizan un paso de amplificación, previo a la detección (en los cuales se ha observado mayor sensibilidad, aunque solo están disponibles en centros de referencia y la obtención del resultado demanda días o meses).

2.1. Detección microscópica de *T. cruzi*. Los parásitos vivos son detectados, por su movilidad, por observación al microscopio luego de una concentración por centrifugación. En situaciones de necesidad y cuando no haya disponibilidad de centrifuga, el parásito puede detectarse por gota fresca o gota gruesa (observación directa). Sin embargo, para fines diagnósticos se recomiendan las pruebas que incluyen un paso de concentración ya que tienen una sensibilidad mucho mayor.¹³

Según el volumen de sangre utilizada las pruebas se denominan Strout o microhematocrito/micrométodo. También se pueden observar parásitos en otros líquidos de punción (tripomastigotes) o en biopsias (nidos de amastigotes) (*Figuras 1 y 2*). En la *Tabla*, se describen los volúmenes de muestra requeridos para cada prueba de laboratorio, así como los conservantes o anticoagulantes en los que se debe tomar la muestra.

2.1.1. Prueba de Strout. Descrito en 1962, es el método recomendado para la detección de parasitemia en pacientes adultos con sospecha de infección aguda o reactivaciones por inmunosupresión.¹⁴ Se realiza a partir de 5 a 10

ml de sangre venosa colectada en un tubo sin anticoagulante (*Tabla*). Luego de la retracción del coágulo, se centrifuga el suero 2 minutos a 800 rpm. El sobrenadante, se coloca en otro tubo y se centrifuga por segunda vez entre 2000 y 2500 rpm durante 10 minutos. Se observa el sedimento en fresco al microscopio a 400X¹⁵ (6 a 8 preparados). Permite concentrar una mayor cantidad de parásitos con respecto a los métodos que utilizan menor volumen (*ver sección 2.1.2*). Un estudio que comparó los resultados obtenidos en 66 pacientes con sospecha de Chagas agudo, demostró una sensibilidad de la prueba de Strout frente al xenodiagnóstico de 61,8 %.¹³

2.1.2. Pruebas de microhematocrito y micrométodo. La prueba del microhematocrito (o capilar), iniciado por Worth¹⁶ ha sido ampliamente aplicado en el diagnóstico cualitativo de la tripanosomiasis africana.¹⁷ Luego Freilij y colab., la han utilizado en la búsqueda de *T. cruzi*¹⁸ y se ha aplicado ampliamente en el ámbito clínico para el diagnóstico de Chagas vertical.¹⁹⁻²¹ Consiste en analizar 0,3 a 0,5 ml de sangre venosa anticoagulada (habitualmente con EDTA o heparina) (*Tabla*). Se cargan 6 capilares y una vez sellados por un extremo, se centrifugan a 3000 rpm durante 40 segundos. Se cortan los capilares en la zona entre glóbulos blancos y plasma y se depositan las dos primeras gotas desde la porción blancos/plasma entre porta y cubreobjetos. La lectura microscópica se realiza a 400X durante 5-10 minutos por capilar. Se describió para esta prueba una sensibilidad frente a la serología de entre 15-82 %.^{8,22,26}

Para evitar el riesgo de cortar el vidrio de los capilares y los accidentes de laboratorio, se ha optimizado el micrométodo en microtubo. Desarrollado por De Rissio y colab.,²⁴ el mismo consiste en analizar 0,5 ml de sangre venosa con una gota de heparina o EDTA. Utilizando un microtubo de 1,5 ml, se centrifuga 1 minuto a 3000 rpm, se utiliza la micropipeta para tomar la interfaz entre glóbulos blancos y plasma y se coloca entre porta y cubreobjetos (al menos 4). La observación se realiza por 20 minutos a 400X. Se describió una sensibilidad frente al xenodiagnóstico y serología de 45 % en niños con infección vertical en el primer año de vida.²⁴

2.1.3. Detección de *T. cruzi* en líquidos de



punción y biopsias. Luego del primer reporte de encefalitis en un paciente co-infectado con *T. cruzi* y VIH en 1990²⁷ y con el aumento de los trasplantes y terapias inmunosupresoras, ha cobrado relevancia la detección del parásito en otros tipos de muestra, para el diagnóstico y seguimiento de la infección en pacientes inmunodeficientes. Además de la parasitemia (ver sección 4.1), se pueden detectar parásitos en muestras de biopsia de piel y otros tejidos, de líquido pleural, líquido pericárdico, líquido cefalorraquídeo (LCR) y líquido peritoneal (Tabla).²⁸⁻³² En cuanto a los líquidos de punción, se centrifugan y se observa el sedimento entre porta y cubreobjetos. Para detectar ni-

dos de amastigotes en las biopsias, se realiza la observación de cortes histológicos luego de coloración con hematoxilina/eosina o Giemsa. Recientemente se describió, la detección de parásitos en líquido de transporte de biopsias. En muestras que hayan sido conservadas en solución fisiológica estéril, se centrifuga el líquido de transporte y se observa el sedimento entre porta y cubreobjetos en paralelo a la biopsia.³³ No se han realizado estudios de evaluación de parámetros analíticos o estandarización para este tipo de pruebas. Una revisión sistemática de reportes de casos de coinfección con VIH ha descrito para el diagnóstico de lesiones a nivel del sistema nervioso central

Tabla. Requerimientos y características de las muestras para realizar las pruebas de laboratorio para detección de la infección por *T. cruzi*

Prueba de laboratorio	Tipo de muestra	Volumen	Recolección	Conservante/ anticoagulante
Parasitemia por prueba de Strout	Sangre entera	10 ml	Punción venosa	Tubo seco, estéril, sin gel separador, ni acelerador de la coagulación
Parasitemia por prueba de microhematocrito	Sangre entera	0,3 a 0,5 ml	Punción venosa	EDTA o heparina como anticoagulante
Parasitemia por prueba de micrométodo	Sangre entera	0,5 ml	Punción venosa	EDTA o heparina como anticoagulante
Detección microscópica en líquidos de punción biopsias	LCR u otros líquidos de punción	La cantidad que se pueda obtener	Punción u otro medio de obtención	Tubo seco, estéril
	Tejidos		Biopsia	Vial estéril con solución fisiológica
PCR	Sangre entera	Bebés: 0,5 ml	Punción venosa	Buffer guanidina EDTA como conservante ³⁹
		Pediátricos: 2 ml		
		Adultos: 5 ml		
	LCR	0,3 ml	LCR por cualquier medio de obtención	Tubo seco, estéril
	Biopsia	25 mg	Biopsia	Vial estéril con solución fisiológica
Serología	Suero	A partir de un mínimo de 1 ml de sangre entera	Punción venosa	Tubo seco, estéril

ml: mililitros, mg: miligramos, EDTA: ácido etilendiaminotetraacético, LCR: líquido cefalorraquídeo.

una sensibilidad de 15 % y 78 % en muestras de biopsia y LCR respectivamente.³⁴

2.1.4. Conclusiones. El rendimiento de estas pruebas ha mostrado buenos resultados en centros de referencia, obteniendo valores de alta sensibilidad y especificidad clínicas para el diagnóstico de Chagas vertical y agudo, siendo de gran utilidad en el manejo de pacientes inmunodeficientes. Tienen la ventaja de no necesitar un laboratorio de alta complejidad y que el resultado puede obtenerse en menos de una hora luego de obtenida la muestra.

Sin embargo, estas pruebas se realizan de forma “casera” y algunas no han sido sometidas a validaciones analíticas, ni clínicas en ensayos prospectivos multicéntricos. Debido a que la detección del parásito depende de la observación de la movilidad de los tripomastigotes, no se han podido implementar programas de calidad externos que permitan evaluar la exactitud de los laboratorios que la realizan, asegurar la calidad en el tiempo y realizar mejoras.²⁶ En efecto, la sensibilidad y especificidad de estas pruebas mayormente han sido evaluadas en el contexto de centros de referencia y fuera de los mismos se ha descrito una baja sensibilidad.^{13,18,21,24,26}

El rendimiento de las mismas se ve influido por variables como la falta de calibración de centrífugas, el tiempo y velocidad de centrifugación, el tiempo de observación del preparado, el tiempo y temperatura en que se han conservado las muestras, la calidad de los reactivos de tinción en el caso de biopsias o la experiencia del operador para detectar el parásito. Por lo que, tradicionalmente se las ha denominado pruebas “operador dependiente”, ya que la sensibilidad clínica depende de las condiciones operativas, del equipamiento disponible y de la experiencia del personal que realiza la observación al microscopio. Por otro lado, las pruebas de microhematocrito y micrométodo fueron optimizadas para el uso de centrífuga para tubos de microhematocrito o microtubos que no están disponibles en todos los centros asistenciales. Y al utilizarse otro tipo de equipamiento se introduce un error que puede modificar el rendimiento de la prueba.

Finalmente, para detectar el movimiento de los tripomastigotes (que depende de la viabilidad) no se deben conservar las muestras, por lo que no se puede planificar el procesamien-

to, de manera de organizar la sistemática rutinaria del laboratorio. Esto junto a la elevada cantidad de tiempo del operador que insumen las pruebas, determina un alto costo en términos de recursos humanos.

2.2. Detección mediante amplificación de *T. cruzi*.

Dada la baja sensibilidad de los métodos microscópicos, se han optimizado métodos parasitológicos de amplificación, y posterior detección que son el estándar de referencia en la etapa aguda de la infección. Estos han mostrado mayor sensibilidad,^{13,35} y pueden también utilizarse para intentar demostrar la presencia del parásito en la fase crónica. Las pruebas basadas en la amplificación de secuencias específicas de ADN de *T. cruzi*, como por ejemplo, PCR, han sido ampliamente utilizadas en trabajos de investigación y tienden a incluirse en la rutina de los laboratorios clínicos.^{26,36,37}

2.2.1. Métodos parasitológicos. Para el diagnóstico de la infección aguda por *T. cruzi* o bien para el aislamiento de parásitos de muestras de pacientes crónicos; se utilizaban métodos de amplificación en hemocultivo, por inoculación en ratones o en triatomos (xenodiagnóstico). Estos métodos tienen la desventaja de requerir vectores o animales de laboratorio, medios de cultivo que deben prepararse en el laboratorio, personal entrenado, tiempos largos de incubación o de desarrollo del ciclo del parásito en el vector en el hemocultivo o xenodiagnóstico, respectivamente (2 meses), cabinas de seguridad biológica, insectario, aves para alimentar a los triatomos, bioterio etc. Actualmente no se realizan en la práctica clínica y son utilizados solo con fines de investigación, por lo que no serán descritos en este artículo.

2.2.2. Métodos moleculares. Las pruebas de amplificación de ácidos nucleicos comenzaron a evaluarse para su uso en el diagnóstico de la infección humana por *T. cruzi* con el advenimiento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de 1991.³⁸ Esta primera técnica (actualmente llamada PCR de punto final) fue utilizada mayormente en trabajos de investigación y ensayos clínicos. Su uso se ha ampliado al ámbito clínico de diagnóstico luego de la estandarización de las pruebas de PCR en tiempo real (PCRq) realizadas en el año 2012 con apoyo de la Organización Mundial de

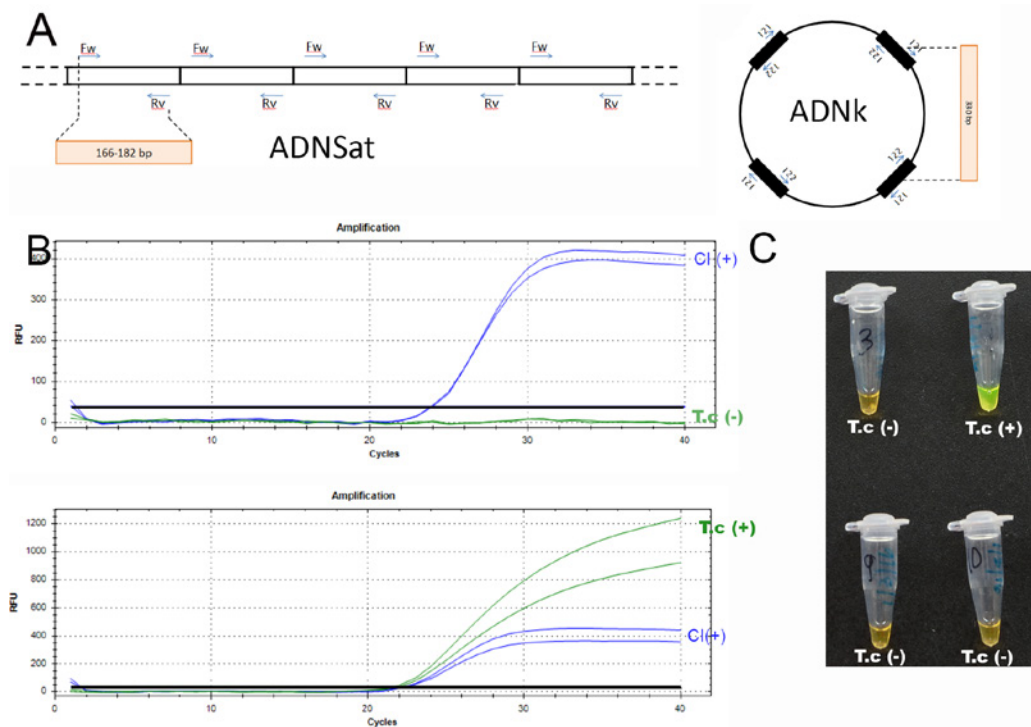
la Salud (OMS) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS).³⁹ Por otro lado, a partir del 2010, se han desarrollado nuevas pruebas de amplificación de ADN/ARN llamadas isotérmicas. Se han reportado para Chagas, dos tipos de pruebas isotérmicas, la amplificación isotérmica mediada por asas (LAMP) y la amplificación de la polimerasa de recombinasa (RPA) y solo la primera ha sido propuesta para el diagnóstico de la infección humana por *T. cruzi*.⁴⁰⁻⁴² Por esto, se describirán en los siguientes apartados las pruebas de PCRq y LAMP.

2.2.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa: PCR. La PCRq ha sido utilizada en gran cantidad de trabajos de investigación y ensayos clínicos para el diagnóstico de la infección con resultados promisorios.

Dos pruebas caseras fueron validadas según normas de diagnóstico del *Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI)*^{43,44} para la detección de ADN del parásito, en muestras clínicas. En base a estos resultados y a aquellos obtenidos en un estudio multicéntrico pro-

movido por la OMS y la OPS, se recomienda la utilización de las pruebas que amplifican secuencias satélites del ADN nuclear (ADNSat) y del ADNk³⁹ (Figura 3A). Se toman 0,5 a 5 ml de sangre periférica en un buffer conservante (preparado con cloruro de guanidina y EDTA) (Tabla). Se extrae el ADN y luego se realiza la amplificación por PCRq utilizando sondas Taqman® cuya fluorescencia se lee en tiempo real y se analiza con un software del mismo equipo (Figura 3B). Para detectar resultados falsos negativos por inhibición o pérdida de la muestra durante el procesamiento, es necesario un control interno de amplificación. Para PCRq de Chagas se han utilizado dos, llamados IAC o RNAasaP, y deben dar señal de amplificación en todos los pocillos para validar el resultado (Figura 3B).^{43,45} Utilizando sangre periférica, se describió una sensibilidad de 84,2 a 100 % para el diagnóstico de Chagas vertical.^{23,26} Se recomienda su uso en reactivaciones en el contexto de la inmunosupresión y seguimiento post tratamiento.

Figura 3. Pruebas de amplificación de ácidos nucleicos para diagnóstico de infección por *T. cruzi* mediante PCR



A) Blancos moleculares utilizados en las reacciones de amplificación de ADN.
B) y C) Visualización de resultados de laboratorio de las pruebas de PCRq y LAMP, respectivamente.
T.c (+) amplificación de ADN de *T. cruzi* detectable; **T.c (-)** amplificación de ADN de *T. cruzi* no detectable;
CI (+) control interno de amplificación de la reacción detectable.

En los últimos años, al menos 8 pruebas comerciales de PCRq han sido desarrolladas, pero aún no existen estudios comparativos que permitan evaluar su calidad y rendimiento. En 2021, se publicó un estudio multicéntrico, en el cual se evaluó el rendimiento diagnóstico del prototipo de uno de estos kits comerciales, que amplifica ADNSat. En el mismo, se obtuvieron valores aceptables de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de infección vertical.³⁷

2.2.2.2. Amplificación isotérmica mediada por bucle: LAMP. Las pruebas isotérmicas, a diferencia de las de PCR, no requieren equipamiento que realice ciclos de cambios de temperatura durante la reacción (termocicladores), ni lectores de fluorescencia, ni software para análisis de datos ya que se realiza una lectura a simple vista del resultado (cambio de color) (Figura 3C). Esto implica menor requerimiento de equipamiento. Luego de la primera descripción de la utilización de esta prueba para la detección de *T. cruzi* en heces de insectos vectores, distintos grupos de investigación han optimizado pruebas de diagnóstico LAMP para la detección de ADN de *T. cruzi*.⁴⁶ Un total de tres pruebas fueron reportadas para detección de *T. cruzi* en humanos. Dos pruebas caseras fueron validadas analíticamente^{41,42} y una de ellas ha sido evaluada en un estudio prospectivo para su uso en el diagnóstico de Chagas vertical con un rendimiento similar al de la prueba del microhematocrito.²⁶ Por otro lado, ha sido evaluado el rendimiento de un prototipo de kit comercial (Loopamp *T. cruzi* detection kit) con paneles de muestras humanas.^{40,47} Sin embargo, al momento, no se encuentra disponible comercialmente.

2.2.3. Conclusiones. Si bien la OPS no ha incluido las pruebas de PCRq en el diagnóstico de Chagas, su uso ha sido incluido en guías de atención de pacientes de Chile y Panamá. En 2022, se realizó en Argentina la recomendación de utilizar PCRq como alternativa al método parasitológico en el algoritmo de diagnóstico de Chagas vertical. Entre los diferentes estudios realizados entre 2010 y 2021 se analizaron alrededor de 1500 bebés en diferentes centros, ubicados en distintas zonas geográficas de Argentina. Se obtuvo una sensibilidad promedio de 93,2 % y especificidad promedio de 99,4 %.⁴⁸

Estas pruebas, han mostrado mayor sensibilidad clínica con respecto a la microscopía para el diagnóstico de Chagas vertical y son útiles en el manejo de pacientes inmunodeprimidos. Además, permiten la automatización, la conservación de las muestras para procesar organizando la rutina del laboratorio y pueden planificarse controles de calidad internos y externos que permitan la mejora continua. En cuanto a las pruebas de LAMP, la ventaja descrita de estas pruebas es que requieren menor equipamiento que la PCRq.

Sin embargo, los insumos de las pruebas de amplificación molecular son costosas y en aquellas zonas donde no hay capacidad instalada para realizar PCRq/LAMP deben derivarse las muestras lo que significa elevar su costo y un mayor tiempo entre la toma de muestra y entrega de resultados con respecto a las pruebas microscópicas. Por otro lado, para las pruebas LAMP, si bien existen varios reportes de su uso para la detección de *T. cruzi*, hasta el momento éstas no han sido validadas clínicamente en estudios prospectivos de cohorte por lo que no han sido recomendadas para el diagnóstico de la infección aguda. Un estudio prospectivo que utiliza una prueba casera de LAMP para el diagnóstico de Chagas vertical describió una menor sensibilidad que la observada para PCRq. Sin embargo, ambas pruebas estaban dirigidas a diferentes blancos del parásito (ADN ribosomal 18S y ADNSat, respectivamente) lo que puede haberse reflejado en la diferencia de sensibilidad observada.²⁶

3. Serodiagnóstico de infección por *T. cruzi*

3.1. Diagnóstico serológico de infección crónica

Las pruebas serológicas, permiten detectar anticuerpos IgG específicos anti-*T. cruzi* circulantes. Son utilizadas en el diagnóstico de laboratorio durante la fase crónica de la infección, la cual se caracteriza por presentar parasitemias bajas e intermitentes⁴⁹ (Figura 2).

Las primeras pruebas serológicas a las que usualmente hoy se llama “convencionales” se basan en lisados o fracciones de antígenos semi purificados de epimastigotes de *T. cruzi* obtenidos mediante cultivo. La aparición de resultados no concluyentes, falsos negativos y falsos positivos ha sido un problema persistentemente reportado para las pruebas convencionales, y no existe un estándar de referencia



(o “prueba de oro”) universalmente aceptada para la confirmación de los resultados. La prueba serológica única ideal, con un 100 % de especificidad y un 100 % de sensibilidad, es poco probable que se consiga; sin embargo, es posible diagnosticar la mayoría de los casos utilizando dos pruebas serológicas (ver sección 3.3). Por lo que se recomienda actualmente una combinación de al menos dos pruebas, una de alta especificidad y una de alta sensibilidad, como “estándar diagnóstico”.⁵⁰

Los métodos indirectos que presentan mayor especificidad y, por lo tanto, han sido propuestos como pruebas confirmatorias son radioinmunoprecipitación (RIPA), inmunofluorescencia indirecta (IFI) y Western blot (WB),^{51,52} sin embargo son de difícil acceso para el diagnóstico clínico. En efecto, RIPA sólo está disponible en Estados Unidos y WB sólo disponible de forma comercial en Europa por lo que no se describirán en este artículo.

3.2. Antígenos de *T. cruzi* utilizados para serodiagnóstico: lisado y antígenos recombinantes.

Los antígenos utilizados para la detección de anticuerpos pueden ser de célula entera, antígeno crudo de extracto celular o fracciones purificadas, antígenos recombinantes y péptidos sintéticos.^{49,53-56} Las pruebas basadas en antígenos recombinantes pueden ser asociados a proteínas de superficie, antígenos citoplasmáticos y/o flagelares. Sin embargo, no todos los hospedadores producen anticuerpos frente a estos antígenos, por lo que el uso de varios antígenos recombinantes, idealmente que representen diferentes estadios del parásito, podrían aumentar la sensibilidad de detección de anticuerpos.⁵⁷ Además existen reportes de que la respuesta inmune varía geográficamente, esto podría impactar en la capacidad de las pruebas para detectar anticuerpos, es por esto que cada zona geográfica debería realizar un análisis de aptitud de los mismos antes de implementarlos como pruebas diagnósticas.^{49,54,57,58}

3.3. Evaluación del rendimiento de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* (1986-2009). En los años ochenta se realizó un estudio de estandarización del diagnóstico serológico de la infección, en el que se observó una baja sensibilidad de las técnicas serológicas evaluadas (Enzimoimmunoensayo (ELISA), hemoaglutinación indirecta

(HAI) e inmunofluorescencia indirecta (IFI).⁵³ Es por esto, que la OPS recomendó que para el diagnóstico se utilicen dos técnicas de antígenos diferentes realizadas en paralelo.⁵¹ Además, se observaron diferencias en la sensibilidad entre las pruebas con diferente principio que emplean antígenos similares. Estas diferencias se deberían principalmente a factores propios de la técnica que interfieren o amplifican el mecanismo de la señal que expresa la unión antígeno-anticuerpo.⁵³ Por otro lado, otros factores como las diferencias regionales en la antigenicidad del parásito debido a las diferentes UDTs, podrían influir en los parámetros diagnósticos de las pruebas y han sido sugeridas como una explicación al rendimiento limitado de las mismas en América Central y del Norte.^{49,57,58} Debido a que los resultados de las pruebas serológicas no son generalizables a otras zonas geográficas y a la potencial variabilidad del desempeño de las pruebas con diferentes principios, la evidencia científica que se encuentra disponible no es suficiente para realizar cambios en el algoritmo de diagnóstico actual. Por lo que, tanto las recomendaciones nacionales como las de OPS, indican que el diagnóstico de la infección debe ser realizado a través del estándar diagnóstico.^{6,8} El mismo considera infectada a una persona que tenga dos resultados reactivos, de pruebas de diferentes principios y antígenos, entre las duplas serológicas: ELISA-HAI; ELISA-IFI; HAI-IFI. Las pruebas deben ser realizadas en paralelo y en caso de que solo una resulte reactiva, se agrega una tercera que no haya sido utilizada en el primer procesamiento. Además, la prueba de HAI debe realizarse en diluciones seriadas, para descartar falsos negativos por el efecto de prozona. Los informes de resultados deben incluir el valor de densidad óptica o relación de positividad, en caso de ELISA o electroquimioluminiscencia (ECLIA); y el título o la dilución, en caso de HAI o IFI. Esto permite identificar los resultados que se encuentran cercanos al valor de corte que en nuestra experiencia podrían ser falsos positivos en caso de embarazadas, o personas que presenten enfermedades autoinmunes.

3.4. Pruebas serológicas en el laboratorio clínico.

Para realizar las dos o tres pruebas requeridas para el estándar diagnóstico, se requiere un mínimo de aproximadamente 150 µL

de suero (que se puede obtener a partir de 1 ml de sangre periférica en tubo seco) (Tabla). Si bien este volumen depende de las pruebas utilizadas, generalmente se requieren entre 5 y 100 μ L por determinación. Las pruebas que se realizan en equipos automatizados requieren un mayor volumen de muestra (hasta 1 ml de suero).

3.4.1. Hemaglutinación Indirecta: HAI. Los anticuerpos presentes en el suero del paciente se detectan por la formación de una red producto de la interacción de estos con los antígenos del parásito, los que se unen previamente a la membrana sensibilizada del glóbulo rojo. Esta red se visualiza como un “manto” en el fondo del pocillo donde se realiza la reacción (Figura 2). Se considera al suero reactivo para la infección por *T. cruzi* cuando el “manto” cubre más del 50 % del fondo del pocillo. En caso de no estar presentes los anticuerpos en el suero del paciente, los glóbulos rojos sensibilizados, sedimentan en el fondo del pocillo, formando un “botón” que cubre menos del 50 % (Figura 2).

Tiene la ventaja de ser una prueba económica y sencilla de implementar en laboratorios, debido a que no requiere equipamiento para la lectura de los resultados que se realiza a simple vista (Figura 2).

3.4.2. Inmunofluorescencia indirecta: IFI. Utiliza el principio de interacción primaria antígeno-anticuerpo. Epimastigotes de cultivo son fijados a un portaobjetos (antígeno) y se incuban con la muestra de suero (anticuerpos). Luego de lavar, se incuban con un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con fluoresceína, que reconoce el complejo antígeno-anticuerpo y se observa el preparado al microscopio de fluorescencia. Los vidrios con antígenos fijados están disponibles comercialmente. Se considera un resultado reactivo si se observa fluorescencia en la membrana del parásito resaltando por sobre la del citoplasma (Figura 2). Entre las pruebas de mayor especificidad, es la más factible de ser implementada, por su bajo costo y complejidad. Si bien se utiliza en un gran número de laboratorios de Argentina y Latinoamérica, presenta desventajas: se necesita un microscopio de fluorescencia y personal entrenado en la visualización del resultado para evitar el riesgo de lecturas erróneas (que generen fal-

sos positivos), por interpretar reactividad de la muestra al observarse fluorescencia solo en el citoplasma del parásito.

3.4.3. Enzoinmunoensayo: ELISA. Las pruebas comerciales de ELISA son utilizadas de rutina en los laboratorios clínicos para el diagnóstico de diversas infecciones, por lo que es una prueba que ha sido muy utilizada también para infección por *T. cruzi*. Consiste en la incubación del suero del paciente en placas de fondo plano donde previamente se han fijado los antígenos (ver sección 3.2). Luego de lavar, se incuban con un anticuerpo secundario anti IgG humana marcado con una enzima. Por último, se agrega una molécula sustrato de la enzima que, al cambiar su conformación molecular, cambia de color (en casos positivos) (Figura 2). Las placas con antígenos fijados están disponibles comercialmente. Aunque la lectura de los resultados puede realizarse a simple vista se recomienda realizar la lectura de la densidad óptica o relación de positividad utilizando un espectrofotómetro para diferenciar con precisión en aquellas muestras con valores de absorbancia cercanas al valor de corte.

Además de su utilidad como una de las pruebas dentro de la dupla serológica para el estándar diagnóstico de la infección crónica, a fines de la década del 2000, se realizó un estudio en el cual se evaluaron las diferentes pruebas serológicas de ELISA comerciales para el control serológico de donantes de sangre. A partir de estos resultados, y dada la elevada sensibilidad observada para estas pruebas de ELISA, actualmente se recomienda su uso en bancos de sangre.^{6,51} Esto no comprende la confirmación del diagnóstico, sino que se trata de un método de pesquisa para exclusión de posibles donantes positivos.

3.4.4. Electroquimioluminiscencia y quimioluminiscencia: ECLIA y CLIA. En los últimos años, se han desarrollado técnicas de ECLIA y CLIA para detección de *T. cruzi* que se realizan mediante equipos automatizados. Consiste en la utilización de antígenos recombinantes solubles marcados con una molécula quimioluminiscente y biotina, la que se une a estreptavidina. Esto permite a los complejos antígeno-anticuerpo formados, en caso de suero positivo, ser capturados por el electrodo. Al ser excitada la molécula quimioluminiscente emite una señal luminosa que es



captada por un fotomultiplicador. Esta tecnología tiene la capacidad de procesamiento de un elevado número de muestras en un período de tiempo menor que las técnicas manuales. La mayor sensibilidad para ECLIA y CLIA, con respecto a las pruebas de ELISA, podría deberse a que utilizan, además de una señal quimioluminiscente o luminiscente, una amplia diversidad de proteínas recombinantes las cuales representan los tres estadios morfológicos y diversidad genética del parásito.^{49,59}

3.4.5. Pruebas Inmunocromatográficas. También conocidas como inmunoensayos de flujo lateral o pruebas rápidas de detección, permiten obtener el resultado en 30 minutos o menos. Consisten en antígenos específicos fijados en una membrana de nitrocelulosa. Contiene un parche impregnado con anticuerpos anti IgG humana conjugados con oro coloidal en el pocillo donde se coloca la muestra. Una vez agregada la muestra, el complejo anticuerpo-anti IgG humana conjugado difunde (flujo lateral) a través de la membrana de nitrocelulosa. En caso de haber anticuerpos específicos contra los antígenos fijados, se unen posteriormente al antígeno, desarrollándose una línea de color rojo que se observa a simple vista. Este tipo de pruebas tienen las ventajas de no necesitar equipamiento, no requerir refrigeración, que se puede

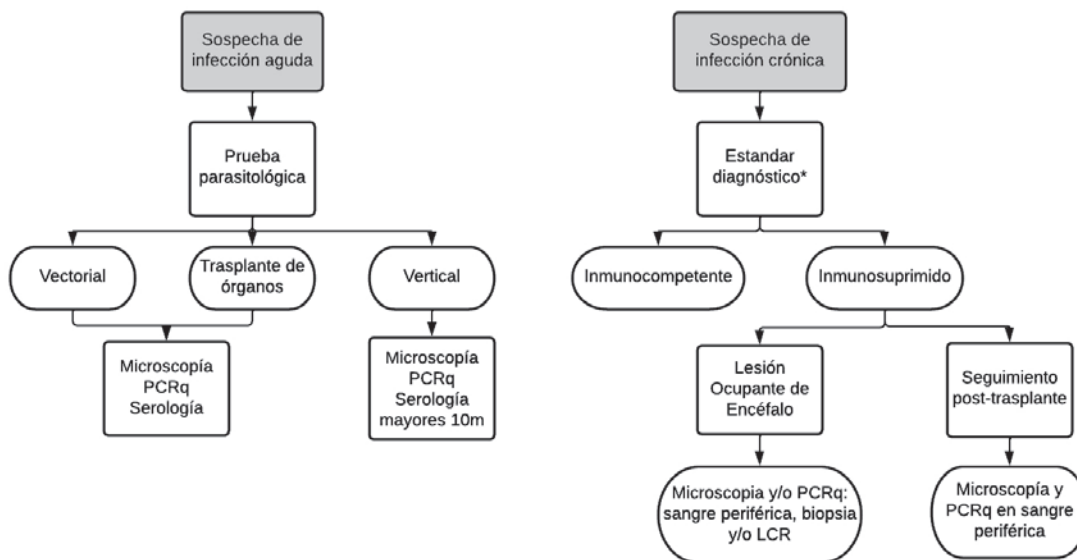
obtener un resultado en minutos y realizar en el mismo sitio donde se realiza la atención, sin necesidad de derivar una muestra de sangre al laboratorio. Sin embargo, en regiones muy calurosas, se deben observar las indicaciones del fabricante con respeto a las temperaturas máximas de conservación y almacenamiento. En Argentina, existen 6 pruebas de este tipo aprobadas para su uso y comercialización. Dos de las cuales se han evaluado en terreno, y se obtuvieron valores de precisión diagnóstica aceptables, por lo que la OPS las ha recomendado como métodos de pesquisa. Hasta el momento, no hay recomendaciones sobre su uso para diagnóstico por lo cual los resultados positivos obtenidos durante la pesquisa deben confirmarse con el estándar diagnóstico (dupla serológica) en el laboratorio.⁶⁰⁻⁶²

4. El uso de las pruebas de diagnóstico en los diferentes escenarios clínicos

4.1. Diagnóstico de infección por *T. cruzi* en fase aguda.

4.1.1 Sospecha de infección aguda por contacto con el vector: se recomienda realizar microscopía previa concentración o PCRq y estándar diagnóstico una vez por mes durante los primeros cuatro meses y a los 6 meses de haberse producido el contacto con la fuente de infección (Figura

Figura 4. Esquema de utilización de pruebas de diagnóstico en pacientes con sospecha de infección por *T. cruzi*



*Estandar diagnóstico: consiste en realizar dos pruebas serológicas de principios diferentes.

PCRq: reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real; m: edad en meses; LCR: líquido cefalorraquídeo.

4). En caso de resultar positiva la serología inicial, considerar infección previa.

4.1.2 Sospecha de infección aguda por recibir órgano de donante infectado: se recomienda realizar microscopía previa concentración y PCRq con la frecuencia descrita en el siguiente esquema postrasplante⁶³ (Figura 4):

- Desde el día cero hasta el 60: semanal.
- Desde el día 61 y hasta el mes 6: quincenal.
- Luego del mes 6 y hasta el año: mensual.

4.1.3 Sospecha de infección vertical: En los niños menores de 10 meses realizar microscopía previa concentración o PCRq y, en caso de ser negativas, serología luego de los 10 meses de vida (Figura 4).

4.2. Diagnóstico infección por *T. cruzi* en fase crónica. Se recomienda realizar búsqueda de anticuerpos por estándar diagnóstico (ver sección 3.3) (Figura 4).

4.3. Diagnóstico de reactivación de la infección *T. cruzi* en personas con infección crónica

4.3.1. Seguimiento por posible reactivación en pacientes que cursan infección crónica e ingresan en estado de inmunosupresión por trasplante de órganos, quimioterapia. Se recomienda realizar: microscopía previa concentración y PCRq cuantitativa para informar carga parasitaria, con la frecuencia descrita en el siguiente esquema postrasplante⁶³ (Figura 4):

- Desde el día cero hasta el 60: semanal.
- Desde el día 61 y hasta el mes 6: quincenal.
- Luego del mes 6 y hasta el año: mensual.

En caso de no tener disponibilidad de PCRq se realiza el seguimiento por microscopía.

4.3.2. Lesión ocupante de encéfalo compatible con chagoma cerebral. La muestra de elección por su accesibilidad y rápido procesamiento es la sangre periférica. Se recomienda realizar microscopía previa concentración y PCRq. En caso de obtener muestra de LCR o biopsia cerebral se recomienda microscopía y PCRq. Para las biopsias se recomienda analizar la muestra y el líquido de transporte (Figura 4).

En caso de no tener disponibilidad de PCRq se realiza el seguimiento por microscopía.

En los pacientes trasplantados todas las muestras de tejido disponibles, incluidas las biopsias endomiocárdicas de protocolo, deben ser evaluadas para detectar la presencia de nidos de amastigotes.⁶³

5. Perspectivas

En los últimos 50 años se han producido grandes avances en la tecnología de diagnóstico del laboratorio clínico que orientan la toma de decisiones clínicas de alta calidad, seguras y eficaces tales como el diagnóstico molecular, el desarrollo de antígenos recombinantes, la automatización de los análisis serológicos y la utilización de pruebas de diagnóstico rápido en los puntos de atención. Sin embargo, debido a que es escasa la inversión en desarrollo, evaluación del rendimiento y calidad de las pruebas de diagnóstico de enfermedades transmitidas por vectores y otras enfermedades que afectan poblaciones vulneradas, no han mejorado el acceso al diagnóstico de la infección por *T. cruzi*. En efecto, se estima que dos terceras partes de las personas con Chagas viven actualmente en zonas urbanas y que solo el 10 %, a nivel mundial lo saben.^{9,11,64} Las pruebas de PCR se implementaron rápidamente para el diagnóstico de COVID-19. Sin embargo, si bien se utilizaron en trabajos de investigación para el diagnóstico de Chagas vertical desde 1998, recién en 2022 comienzan a ser implementadas en los laboratorios clínicos e incluida en normas de diagnóstico en Argentina. Con las pruebas diagnósticas disponibles actualmente y el avance en las evaluaciones de la calidad y las validaciones de nuevas tecnologías realizadas en los últimos años, es posible implementar un diagnóstico de calidad para detectar a tiempo la infección por *T. cruzi*, tanto en laboratorios con recursos limitados como en aquellos centros de alta complejidad que diariamente analizan un gran número de muestras.⁶⁶ Las claves para lograr los objetivos de desarrollo sostenible planteados por los organismos internacionales son la concientización de la población, la motivación y capacitación del personal sanitario y el compromiso político a todos los niveles.

Agradecimientos

Ernesto Gulin por los preparados histológicos, Marisa Pico, Octavio Fusco y Patricia Bustos por las muestras fotográficas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: Second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009; 104(7):1051-4.
2. Lima L, Espinosa-Álvarez O, Ortiz PA, et al. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multi-



- locus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). *Acta Trop* 2015; 151:166-77.
3. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop* 2018; 184:38-52.
 4. World Health Organization. Relevé épidémiologique hebdomadaire. *Weekly epidemiological record* 2015; 90 (6): 33-40. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/242317/WER9006.PDF?sequence=1&isAllowed=y>.
 5. Washington JA. Principles of Diagnosis, Medical Microbiology, 4^{ta} ed. (Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston: 1996).
 6. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad De Chagas). 2018 3^{er} Edición. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recursos/guias-para-la-atencion-al-paciente-infectado-con-trypanosoma-cruzi-enfermedad-de-chagas>.
 7. Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 2012; 26(2):275-91.
 8. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. 2018. Disponible en: <http://iris.paho.org/xmlui/handle/10665.2/49653>.
 9. Burrone MS, Klein K, Alonso JP, et al. Estrategia para mejorar el acceso al tratamiento etiológico para la enfermedad de Chagas en el primer nivel de atención en Argentina. *Rev Panam Salud Publica* 2017; 41:e20.
 10. Danesi E, Codebó MO, Sosa-Estani S. Transmisión congénita de *Trypanosoma Cruzi*: Argentina 2002-2014. *Medicina (Buenos Aires)* 2019; 79 (2):81-9.
 11. Cucunubá ZM, Manne-Goehler JM, Díaz D, et al. How universal is coverage and access to diagnosis and treatment for Chagas disease in Colombia? A health systems analysis. *Soc Sci Med* 2017; 175:187-98.
 12. Organización Panamericana de la Salud. ETMI-Plus: Marco para la eliminación de la transmisión materno-infantil del VIH, la sífilis, la hepatitis y la enfermedad de Chagas. 2017. Disponible en: <https://www.paho.org/es/documentos/etmi-plus-marco-para-eliminacion-transmision-materno-infantil-vih-sifilis-hepatitis>.
 13. Flores MA, Trejo A, Paredes AR, et al. El método de concentración de Strout en el diagnóstico de la fase aguda de la enfermedad de Chagas. *Bol Chil Parasitol* 1966; 21:38-45.
 14. Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol* 1962; 48:100-8.
 15. Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben". Enfermedad de Chagas y otras Parasitosis. 8^a ed. Buenos Aires: Raúl Conforti, El instituto; 1996.
 16. Worth RM. The heparinized capillary tube as an epidemiologic tool. II. Concentration of blood parasites by centrifugation. *Am J Hyg* 1964; 80:70-4.
 17. Woo PT. The haematocrit centrifuge for the detection of trypanosomes in blood. *Can J Zool* 1969; 47(5):921-3.
 18. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micro-method for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol* 1983; 18(2):327-30.
 19. La Fuente C, Urjel R, Darras C, Saucedo E. Uso de tubos de microhematocrito para el diagnóstico rápido de la enfermedad de Chagas y malaria. [Use of microhematocrit tubes for the rapid diagnosis of Chagas disease and malaria]. *Ann Soc Belg Med Trop* 1985; 65(Suppl 1):95-9.
 20. Bittencourt AL. Congenital Chagas disease as a public health problem. *Ann Soc Belg Med Trop* 1985; 65(Suppl 1):103-6.
 21. Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis* 1995; 21(3):551-5.
 22. Messenger LA, Bern C. Congenital Chagas disease: current diagnostics, limitations and future perspectives. *Curr Opin Infect Dis* 2018; 31(5):415-421.
 23. Messenger LA, Gilman RH, Verastegui M, et al. Toward Improving Early Diagnosis of Congenital Chagas Disease in an Endemic Setting. *Clin Infect Dis*. 2017; 65(2):268-75.
 24. De Rissio AM, Riarte AR, García MM, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(5):838-45.
 25. Velázquez EB, Rivero R, De Rissio AM, et al. Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop* 2014; 137:195-200.
 26. Bisio MMC, Rivero R, González N, et al. Diagnostic Accuracy of Two Molecular Tools for Diagnosis of Congenital Chagas Disease. *Mol Diagn Ther*. 2021; 25(6):791-801.
 27. Del Castillo M, Mendoza G, Oviedo J, et al. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *Am J Med*. 1990; 88(6):693-4.
 28. Ferreira MS, Nishioka Sde A, Silvestre MT, et al. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 1997; 25(6):1397-400.
 29. Iliovich E, López R, Kum M, et al. Peritonitis espontánea chagásica en un enfermo de Sida. *Medicina (B Aires)*. 1998; 58(5 Pt 1):507-8.
 30. Sartori AM, Sotto MN, Braz LM, et al. Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with AIDS. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1999; 93(6):631-2.
 31. Concetti H, Retegui M, Pérez G, et al. Chagas' disease of the cervix uteri in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Hum Pathol* 2000; 31(1):120-2.

32. Lattes R, Lasala MB. Chagas disease in the immunosuppressed patient. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(4):300-9.
33. Lopez-Albizu C, Bravo MP, Pico M, et al. Case report of Chagas disease reactivation: new diagnosis tool by direct microscopic observation of biopsy specimen and its preservation fluid. *Rev Soc Bras Med Trop* 2020; 54:e20200326.
34. Almeida EA, Ramos Júnior AN, Correia D, et al. Co-infection *Trypanosoma cruzi*/HIV: systematic review (1980-2010). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2011; 44(6):762-70.
35. Chiari E, Dias JC, Lana M, et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22(1):19-23.
36. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3(4):e419.
37. Benatar AF, Danesi E, Besuschio SA, et al. Congenital Chagas Disease Study Group. Prospective multicenter evaluation of real time PCR Kit prototype for early diagnosis of congenital Chagas disease. *E Bio Medicine* 2021; 69:103450.
38. Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, et al. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 48(2):211-21.
39. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5(1):e931.
40. Besuschio SA, Picado A, Muñoz-Calderón A, et al. *Trypanosoma cruzi* loop-mediated isothermal amplification (*Trypanosoma cruzi* Loopamp) kit for detection of congenital, acute and Chagas disease reactivation. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(8):e0008402.
41. Rivero R, Bisio M, Velázquez EB, et al. Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* by colorimetric loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A potential novel tool for the detection of congenital Chagas infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017; 89(1):26-8.
42. Ordóñez D, Fernández-Soto P, Fernández-Martín AM, et al. A *Trypanosoma cruzi* Genome Tandem Repetitive Satellite DNA Sequence as a Molecular Marker for a LAMP Assay for Diagnosing Chagas' Disease. *Dis Markers* 2020; 2020:8074314.
43. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, et al. Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(1):e2000.
44. Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn* 2015; 17(5):605-15.
45. Cura CI, Ramírez JC, Rodríguez M, et al. Comparative Study and Analytical Verification of PCR Methods for the Diagnosis of Congenital Chagas Disease. *J Mol Diagn* 2017; 19(5):673-81.
46. Thekisoe OM, Rodriguez CV, Rivas F, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(5):855-60.
47. Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11(7):e0005779.
48. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. Algoritmos de diagnóstico y tratamiento para el control de las infecciones perinatales por VIH, sífilis, hepatitis B y Chagas. Iniciativa Etmí-Plus. 2022. Disponible en: https://bancos.salud.gob.ar/sites/default/files/2022-06/Algoritmos_d_diag_y_trat_IP_VIH_Sifilis_VHB_y_Chagas_en_pliego.pdf.
49. Abras A, Gállego M, Llovet T, et al. Serological Diagnosis of Chronic Chagas Disease: Is It Time for a Change? *J Clin Microbiol* 2016; 54(6):1566-1572.
50. Pan American Health Organization (PAHO), WHO. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Published online 2019. Disponible en: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/49653/9789275120439_eng.pdf.
51. Otani MM, Vinelli E, Kirchoff LV, et al. WHO comparative evaluation of serologic assays for Chagas disease. *Transfusion* 2009; 49(6):1076-82.
52. Brossas JY, Griselda B, Bisio M, et al. Evaluation of the Chagas Western Blot IgG Assay for the Diagnosis of Chagas Disease. *Pathogens* 2021; 10(11):1455.
53. Camargo ME, Segura EL, Kagan IG, et al. Three years of collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas: an appraisal. *Bull Pan Am Health Organ* 1986; 20(3):233-44.
54. Duarte LF, Flórez O, Rincón G, et al. Comparison of seven diagnostic tests to detect *Trypanosoma cruzi* infection in patients in chronic phase of Chagas disease. *Colomb Med (Cali)* 2014; 45(2):61-6.
55. Bhattacharyya T, Falconar AK, Luquetti AO, et al. Development of peptide-based lineage-specific serology for chronic Chagas disease: geographical and clinical distribution of epitope recognition. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; 8(5):e2892.
56. Longhi SA, Brandariz SB, Lafon SO, et al. Evaluation of in-house ELISA using *Trypanosoma cruzi* lysate and recombinant antigens for diagnosis of Chagas disease and discrimination of its clinical forms. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 87(2):267-71.
57. Caicedo Díaz RA, Forsyth C, Bernal OA, et al. Comparative evaluation of immunoassays to improve



- access to diagnosis for Chagas disease in Colombia. *Int J Infect Dis* 2019; 87:100-8.
58. Majeau A, Murphy L, Herrera C, et al. Assessing *Trypanosoma cruzi* Parasite Diversity through Comparative Genomics: Implications for Disease Epidemiology and Diagnostics. *Pathogens* 2021; 10(2):212.
59. Flores-Chavez MD, Sambri V, Schottstedt V, et al. Evaluation of the Elecsys Chagas Assay for Detection of *Trypanosoma cruzi*-Specific Antibodies in a Multicenter Study in Europe and Latin America. *J Clin Microbiol* 2018; 56(5):e01446-17.
60. Crudo F, Piorno P, Krupitzki H, et al. How to implement the framework for the elimination of mother-to-child transmission of HIV, syphilis, hepatitis B and Chagas (EMTCT Plus) in a disperse rural population from the Gran Chaco region: A tailor-made program focused on pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis* 2020; 14(5):e0008078.
61. Lopez-Albizu C, Danesi E, Piorno P, et al. Rapid Diagnostic Tests for *Trypanosoma cruzi* Infection: Field Evaluation of Two Registered Kits in a Region of Endemicity and a Region of Nonendemicity in Argentina. *J Clin Microbiol* 2020; 58(12):e01140-20.
62. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol* 2011; 52(7):2506-12.
63. Sociedad Argentina de Infectología. Evaluación infectológica para receptores de trasplantes de órganos sólidos. 2012. Disponible en: https://drive.google.com/file/d/1OQZHhC1o9OntS_U2yfiPFmogoQJgoluR/view?pli=1.
64. Sanmartino M, Avaria A, Gómez i Prat J, et al. Que no tengan miedo de nosotros: El Chagas según los propios protagonistas. *Interface (Botucatu)*. 2015; 19(55):1063-75.
65. Russomando G, de Tomassone MM, de Guillen I, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59(3):487-91.
66. Rivero R, Bisio M. La respuesta del sistema científico tecnológico frente al Covid-19 como oportunidad para repensar el diagnóstico de Chagas. *Revista Cel* 2022; 72 (3):6-13.

Texto recibido: 30 de junio de 2022.

Aprobado: 4 de octubre de 2022.

Conflictos de interés: Las autoras no tienen conflictos de interés ni han recibido financiamiento.

Forma de citar: Lopez Albizu C, Rivero R, Ballering G et al. Diagnóstico de laboratorio de la infección humana por *Trypanosoma cruzi*. Desafíos en la región de las Américas. *Rev. Hosp. Niños (B. Aires)* 2022;64 (286):145-149.