



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE MAGISTER EN
MICROBIOLOGÍA MOLECULAR

ANLIS “Dr. Carlos G. Malbrán”- UNSAM

**“UTILIDAD DEL PAPEL DE FILTRO PARA EL
DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR
*Trypanosoma cruzi***

AUTORA: Bioq. MARÍA CECILIA IRURTIA

DIRECTOR: Dr. ALEJANDRO GABRIEL SCHIJMAN

CO-DIRECTORA: Dra. GRACIELA MONTENEGRO

Buenos Aires, Argentina

2016

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi* y afecta entre 6 y 7 millones de personas en el mundo, la mayoría de ellas residentes en América Latina. El diagnóstico de certeza implica la demostración de la presencia del parásito durante la fase aguda de la infección y la detección de anticuerpos específicos en la etapa crónica; esto presenta limitaciones, debido a la baja sensibilidad de las técnicas parasitológicas y a la baja especificidad de las inmunológicas. Las técnicas moleculares, que detectan secuencias específicas de ADN del parásito son una alternativa, pero sólo se encuentran disponibles en centros de mediana o alta complejidad. En este contexto, nos propusimos evaluar la posibilidad de utilizar el papel de filtro como soporte de sangre para realizar el diagnóstico molecular de la infección por *T. cruzi*, ya que es una muestra que se puede derivar con facilidad sin perder calidad y es factible aprovechar la misma tarjeta del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal, que es obligatorio en Argentina. Se evaluaron distintas metodologías de extracción del ADN en papel de filtro, siendo la utilización de columnas comerciales previa incubación con buffer de lisis de tejido la opción más conveniente, ya remueve eficientemente los inhibidores del papel de filtro. Se evidenció además el pasaje de ADN entre tarjetas contiguas por lo que las mismas se deben conservar separadas para evitar contaminaciones. El límite de detección en papel de filtro fue 8.98 (CI 95% 6.59 -15.04) y 10.33 (CI 95% 7.649 -17.11) eq.par/ml para k-DNA y sat-DNA respectivamente (PCR convencional) y la sensibilidad analítica fue de 1 eq par/ml para la PCR en tiempo real multiplex dirigida a sat-DNA más un control interno de inhibición, mientras que en sangre directa resultaron una concentración de un orden menor en todos los casos. La sensibilidad clínica de las amplificaciones a partir del papel de filtro (tomando como referencia la sangre directa) en recién nacidos, hijos de madres con serología positiva para Chagas fue 94, 88 y 78.9 % para k-DNA, sat-DNA y PCR en tiempo real, respectivamente y en pacientes inmunocomprometidos con riesgo de reactivación chagásica fue de 80, 80 y 81% para k-DNA, sat-DNA y PCR en tiempo real, respectivamente. En todos los casos, la especificidad fue del 100 %. También se evaluó la sensibilidad y especificidad referidas al diagnóstico definitivo (micrométodo y serología) resultando entre 76.9 y 84.6 % para las muestras en papel de filtro y entre 92.3 y 100 % para las muestras en sangre directa La concordancia entre las 3 metodologías de amplificación dió un índice Kappa generalizado

de 0.9617 (“Muy Bueno” según interpretación de Landis y Koch, 1977). Asimismo se pudo confirmar el diagnóstico de Chagas congénito a partir de tarjetas originales de pesquisa neonatal y estimar a carga parasitaria al momento del nacimiento.. Hemos llegado a la conclusión que es posible utilizar el papel de filtro como una alternativa más en el diagnóstico de dicha infección ya que aporta ventajas con respecto a las muestras convencionales, en cuanto a la facilidad de toma de muestra, volumen de sangre requerido, condiciones de conservación y de transporte para su derivación, especialmente dirigido a personas que residen en zonas alejadas de los centros de diagnóstico.

Palabras clave: papel de filtro, *Trypanosoma cruzi*, Chagas, PCR

AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mi director de tesis Dr. Alejandro Schijman por estar siempre dispuesto a guiarme, ayudarme y escucharme con paciencia y generosidad, también a mi co- Directora, compañera y amiga Dra. Graciela Montenegro por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por enseñarme con tanta pasión y energía sobre las técnicas moleculares y sobre *la vida*. Además quiero agradecer especialmente la colaboración de Gustavo Saldaña, Juan Carlos Ramirez, Natalia Juiz, Susana Besuschio y María de los Ángeles Curto del INGEBI, a la Dra. Alba Abras del Hospital Sant Pau de Barcelona, a Sebastián Oderiz, a mis compañeros del Hospital Prof. A. Posadas: Graciela Peluffo, Nora Bovone, Alejandra Magdaleno, Verónica Lukjaniek y Juan María García por sus desinteresados aportes que contribuyeron a la concreción de esta tesis, a la Jefa de Microbiología Dra. Susana Di Bartolomeo y a la Jefa del Servicio de Bioquímica Dra. Silvia Balconi por haberme apoyado en este proyecto. Por último un eterno agradecimiento a mis padres por haberme educado con tanto amor por la vida, las personas y la ciencia. A mi familia, a Jorge y en especial a mi hijo por regalarme su sonrisa todos los días.

ÍNDICE	Página
INTRODUCCIÓN	10
VIAS DE TRANSMISIÓN	12
Vía vectorial	12
Reservorios	13
Vías de transmisión no vectoriales	13
EPIDEMIOLOGÍA	14
CICLO BIOLÓGICO DEL <i>T. cruzi</i>	17
Diversidad genética de <i>T. cruzi</i>	18
ENFERMADAD DE CHAGAS	21
Pacientes inmunocomprometidos	22
TRATAMIENTO	23
DIAGNOSTICO	24
Métodos parasitológicos directos	24
Métodos parasitológicos indirectos	26
Diagnóstico de Chagas congénito	26
Diagnóstico de fase crónica	27
Diagnóstico molecular	30
PCR en tiempo real	35
Diagnóstico molecular de <i>T. cruzi</i> en el Hospital Prof. A. Posadas	36
USO DEL PAPEL DE FILTRO COMO SOPORTE DE MUESTRAS	
BIOLÓGICAS	37
Uso del papel de filtro en el Programa de pesquisa Neonatal	37
Uso del papel de filtro para el diagnóstico de enfermedades	
infecciosas	39
JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	40
Ventajas de utilizar este tipo de soporte	42
Desventajas de utilizar este tipo de soporte	42
OBJETIVOS	44
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46

MATERIALES Y MÉTODOS	47
Materiales utilizados en los experimentos de la tesis	48
MÉTODOS:	49
Protocolos de amplificación utilizados en la tesis	49
PCR convencional	49
Técnica de PCR para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de <i>T. cruzi</i> (<i>k- DNA</i>)	49
Técnica de PCR para la detección de ADN satélite de <i>T. cruzi</i> (sat- DNA).	50
Técnica de PCR para detección de ADN del gen control β -actina	50
Electroforesis de ADN en geles de agarosa	51
PCR en tiempo real	51
ITEM I) Preparación de matriz	53
ITEM II) Protocolo de extracción de ADN de sangre directa	53
ITEM III) Comparación de métodos de extracción de ADN de <i>T. cruzi</i> en matriz sanguínea absorbidos en papel de filtro	54
III.1 MÉTODO 1	54
III.2 MÉTODO 2	55
III.3 MÉTODO 3	55
III.3.1. Método de extracción de ADN de papel de filtro	55
ITEM IV) Verificación de la presencia de inhibidores	56
ITEM V) Determinación de sensibilidad analítica	57
V) A) Curvas de sensibilidad de parásitos	57
V) B) Curvas de sensibilidad de ADN	57
V) C) Límite de detección (LoD):	59
ITEM VI) Estudio de especificidad analítica	59
ITEM VII) Estudio de contaminación entre papeles de filtro contiguos	59
ITEM VIII) Muestras clínicas estudiadas durante el desarrollo de la tesis	60
ITEM IX) Evaluación de SC, E, VPP y VPN respecto a la PCR en	61

sangre directa como método de referencia	
ITEM X) Evaluación de Sensibilidad clínica respecto al diagnóstico convencional como estándar de oro para la detección molecular de Chagas congénito.	62
ITEM XI) Estudio de especificidad clínica con respecto al diagnóstico serológico como estándar de oro	62
ITEM XII) Criterios de interpretación de resultados	63
ITEM XIII) Estudio de concordancia	63
ITEM XIV) Estudio sobre muestras de pesquisa neonatal	64
RESULTADOS	65
Objetivo específico 1	67
Objetivo específico 2	69
FASE 1) Ensayos de sensibilidad analítica	70
FASE 2) Ensayos de especificidad	76
FASE 3) Estudio de contaminación entre papeles de filtro contiguos	76
Objetivo específico 3	77
FASE 1) I) Evaluación de SC, E, VPP y VPN	78
FASE 2: Evaluación de SC y EC respecto al diagnóstico convencional	84
FASE 3) Estudio de concordancia	86
FASE 4) Estudio sobre muestras de pesquisa neonatal	86
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	98
ANEXO: Procedimiento para la toma de la muestra en papel de filtro para pesquisa neonatal	100
REFERENCIAS	103

ABREVIATURAS:

BC: Buffy Coat

Ct: cycle threshold ó ciclo umbral

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: 33 desoxirribonucleótidos trifosfato

DTU: unidades discretas de tipificación

E: Especificidad

EDTA: Ácido etilen di amino tertraacético

ELISA: Ensayo inmuno-enzimático

Eq.par /ml: equivalentes de parásitos /mililitro

HAI: Hemoaglutinación indirecta

HIV: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

IAC: Control Interno de Amplificación

IC: Intervalo de Confianza

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

k- DNA: DNA del kinetoplasto

LCR: Líquido cefalorraquídeo

LOE: Lesión Ocupante de Espacio

ND: No detectado

NRZ: No realizado

OPS: Organización Panamericana de la Salud.

OMS: Organización Mundial de la Salud

Papel S&S: Papel Schleicher & Schuell

Pb: pares de base

PCR en RT: Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

RN: Recién Nacido

S: Sensibilidad

Sat-DNA: DNA satélite

SNC: Sistema Nervioso Central

TAE: Tris-Ácido acético- EDTA

TDR: Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases

TMO: Transplante de Médula Ósea

Tx: Transplante

D+: donante con serología positiva para Chagas

VPN: Valor Predictivo Negativo

VPP: Valor Predictivo Positivo

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*. Es reconocida por la Organización Mundial de la Salud como una de las 13 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo (Hotez y col., 2007), es endémica en 21 países de la Región de las Américas y está asociada con múltiples factores sociales y ambientales que exponen a millones de personas a la infección (PAHO/WHO, 2014).

El parásito es transmitido al humano por insectos vectores de la familia de los Triatomíneos, los cuales viven principalmente en las áreas rurales de las regiones de clima cálido y seco, buscan habitar junto al hombre y los reservorios domésticos para tener disponible su fuente de alimento. Para eso, anidan en las casas con paredes sin revoque, techos de paja y en lugares próximos al domicilio que constituyen el peridomicilio, como gallineros, corrales y depósitos.

Entre los principales factores determinantes de riesgo de infección por vía vectorial se destacan: habitar en viviendas precarias, principalmente en zonas rurales y suburbanas, carecer de recursos económico- sanitarios, residir en áreas de pobreza y muchas veces con altas tasas de migración, así como pertenecer a grupos vinculados con el trabajo agrícola estacional en zafras y cosechas.

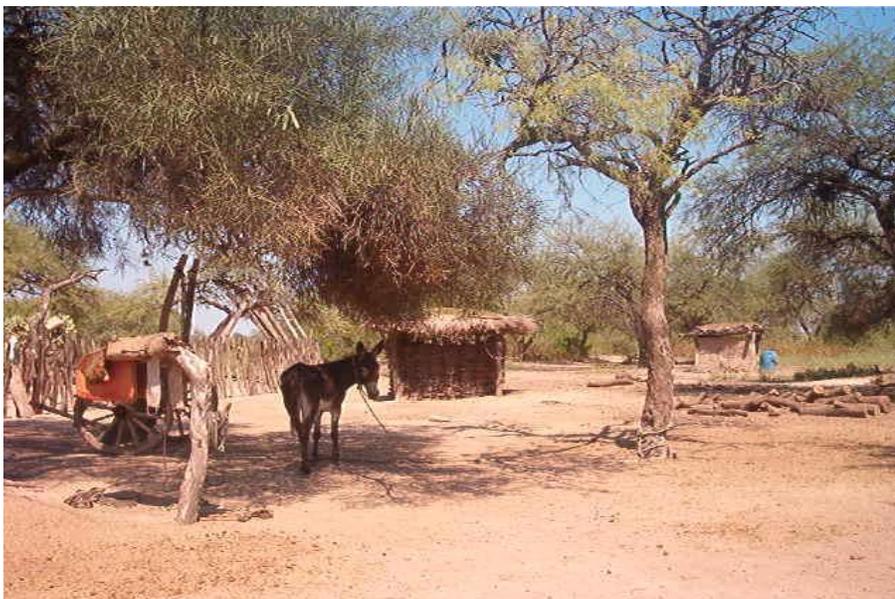


Figura 1: Viviendas características con techo de paja, donde habitan las vinchucas. Santiago del Estero, departamento de General Taboada. (Enero 2004, Cecilia Irurtia)

En las últimas décadas se han implementado varias estrategias de control que han logrado disminuir el número de casos (PAHO/WHO, 2010); aun así, hoy en día la enfermedad de Chagas continúa siendo un grave problema de Salud pública debido a varios motivos, en primer lugar por la pérdida de calidad de vida por discapacidad, por la discriminación social y laboral, porque limita la cantidad de donantes de sangre y órganos, porque las mujeres pueden transmitir la enfermedad a su descendencia, por la gravedad de la reactivación chagásica en pacientes inmunocomprometidos.

Las estrategias de prevención y control de la enfermedad de Chagas deben incluir:

- La lucha contra el vector
- El diagnóstico de laboratorio
- La atención médica.
- La educación sanitaria

VÍAS DE TRANSMISIÓN

Vía vectorial:

El *Trypanosoma cruzi* se transmite al ser humano y a otros mamíferos a través de insectos hemípteros que se alimentan de sangre (hematófagos). Se considera que existen más de 140 especies de triatomos siendo las regiones tropicales y subtropicales de Sud América las de mayor diversidad. La especie más importante en los países del Cono Sur, es *Triatoma infestans*, conocido en la mayor parte de Argentina como “vinchucas” o “chinchas” (Guía para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. Programa Nacional de Chagas). En Chile se describe al vector silvestre *Mepraia spinolai* como el segundo Triatomino responsable de la transmisión de *T. cruzi* (Canals y col., 2000). Otros vectores capaces de transmitir la enfermedad de Chagas de importancia en la región son: *Rhodnius prolixus* (Yoshioka y col., 2011), *Triatoma dimidiata* (Calderón-Arguedas y col., 2001), *Panstrongylus geniculatus* (Carrasco y col., 2014) (Figura 2)

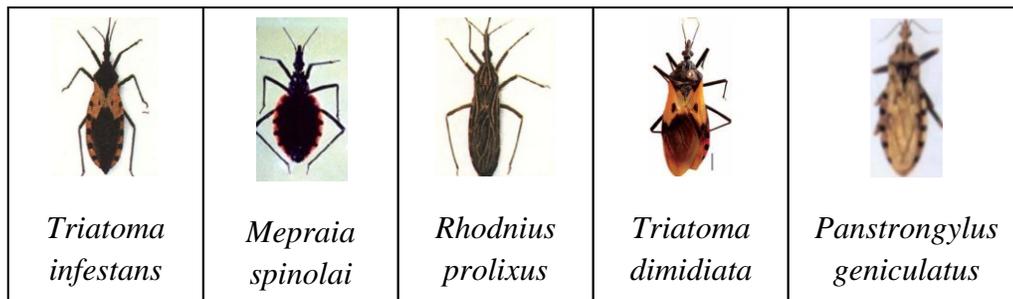


Figura 2. Especies vectoras de *T. cruzi*.

Reservorios:

Trypanosoma cruzi, es capaz de infectar casi todos los tejidos de sus hospederos mamíferos y se propaga en el entorno en ciclos de transmisión múltiples que pueden o no estar conectados. Esta plasticidad biológica, que es probablemente el resultado de la considerable heterogeneidad del taxón, es un ejemplo de una adaptación exitosa y un patrón epidemiológico complejo (Noireau y col. 2010). Un total de 180 especies de mamíferos se han encontrado naturalmente infectados por *T. cruzi* (Herrera, 2010) los cuales constituyen el reservorio natural del parásito: animales silvestres tales como armadillos, marsupiales, roedores, murciélagos, primates y ciertos animales domésticos como perros y gatos; estos últimos se ha demostrado que pueden presentar altas cargas parasitarias (Gurtler y col. 2007).

Vías de transmisión no vectoriales:

En estos casos la enfermedad de Chagas es transmitida sin la participación de la vinchuca, las vías son:

a) Transmisión vertical: de la madre infectada a su hijo durante el embarazo, dicha vía de transmisión ha ido aumentando su importancia relativa respecto a la vectorial, tras a la implementación de mecanismos de control del vector (Blanco y col., 1999). Debido a las migraciones, resulta de vital importancia el estudio de las embarazadas, incluso en zonas no

endémicas, para implementar el tratamiento en los recién nacidos que adquieran la enfermedad (Blasco y col., 2011).

b) Transfusión de sangre infectada. Por la ley 22.990 (año 1983), en la Argentina se controla obligatoriamente la sangre de los donantes. Ante un resultado positivo se descarta la sangre y se comunica al donante la necesidad de control médico (Plan Nacional de Sangre, Ministerio de Salud de la Nación).

c) Transplante de órganos infectados a receptores seronegativos (Marquez y col., 2013; Kransdorf y col., 2014), se han reportado incidencias de reactivación post-transplante de hasta 42.9 % en caso de transplante cardíaco (Workshop cucaiba, 2008)

d) Ingesta de parásitos, principalmente por consumo de alimentos contaminados con heces del vector (Toso y col., 2011)

También se debe tener presente el riesgo de transmisión del parásito en caso de accidentes con muestras biológicas y entre usuarios de drogas inyectables (Scapellato y col., 2006)

EPIDEMIOLOGÍA

Entre las enfermedades transmisibles tropicales, la enfermedad de Chagas es la de mayor prevalencia en los países de América Latina. Su carga de enfermedad en la región es cinco veces mayor que la malaria y mayor que todas las demás enfermedades tropicales agrupadas. Hasta la fecha, las iniciativas regionales puestas en marcha en América Latina (del Cono Sur, Andina, Centroamericana y Amazónica) han permitido reducir drásticamente el número de casos, que pasó de entre 16 y 18 millones en 1990 a unos ocho millones en 2006 (Boletín integrado de vigilancia. Min. Salud, 2011). La transmisión vectorial de la enfermedad se ha interrumpido en Chile, Uruguay, Brasil y amplias zonas de la Argentina, Bolivia, Paraguay, Perú y América central. La Organización Mundial de la Salud ha estimado, para Latinoamérica, que cerca de 8 millones de personas permanecen hoy infectadas por *T. cruzi*, con una incidencia anual de 40 mil casos vectoriales y 12 mil

decesos anuales (OPS/OMS, 2006). Además, alrededor de 100 millones de personas estarían en riesgo de contraer la infección. En Argentina, de acuerdo a estimaciones del año 2005, el número de infectados por *T. cruzi* sería de alrededor de 1,6 millones de individuos, de los cuales 300.000 presentarían cardiopatías y aproximadamente 7.3 millones de individuos viven con el riesgo de infectarse, por lo que se considera la principal endemia del país. La situación actual de control de Chagas en el país, es heterogénea entre las distintas regiones y provincias. La seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en embarazadas en el país fue de 6,8% en 2000 y 4,84% en 2010. En base a estos datos, se estima que cada año nacen 1300 niños infectados por transmisión congénita. Cabe consignar que 9 de cada 10 niños tratados en fase aguda y 8 de cada 10 niños tratados en fase crónica se curan. La prevalencia media de infección por *T. cruzi* en niños menores de 14 años fue de 2,3 % en 2010. Entre 2009 y 2010 algunos indicadores relacionados con la vigilancia entomológica y el control del vector han mejorado, al igual que los indicadores relacionados con el control de la transmisión no vectorial y la atención médica. No obstante todavía no se ha logrado la interrupción de la transmisión vectorial y el control de la transmisión congénita en todo el país. Actualmente, el escenario nacional de la enfermedad de Chagas es el siguiente:

- Situación de alto riesgo para la transmisión vectorial: las provincias de Chaco, Formosa, Santiago del Estero, San Juan, Mendoza y Córdoba presentan una reemergencia de la transmisión vectorial de Chagas debido a un aumento de la infestación domiciliar y a una alta seroprevalencia en grupos vulnerables.
- Situación de riesgo moderado para la transmisión vectorial: las provincias de Catamarca, Corrientes, La Rioja, Misiones, Santa Fe, San Luis, Salta, y Tucumán, muestran una situación de riesgo intermedio con un índice de reinfestación mayor al 5% en algunos departamentos, e insuficiente cobertura de vigilancia en algunos casos.
- Situación de bajo riesgo para la transmisión vectorial: las provincias de Jujuy, Entre Ríos, La Pampa, Neuquén y Río Negro lograron certificar la interrupción de la transmisión vectorial.

Situación de riesgo universal: las 24 jurisdicciones poseen riesgo de transmisión congénita derivado de las migraciones internas e internacionales de países vecinos con elevada endemidad. (Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud de la Nación)

En las últimas décadas se han observado casos de Chagas con mayor frecuencia en Estados Unidos, Canadá, muchos países europeos y algunos del Pacífico Occidental. Esto obedece sobre todo a la movilidad de la población entre América Latina y el resto del mundo. (WHO, nota descriptiva Nro. 340, 2016)

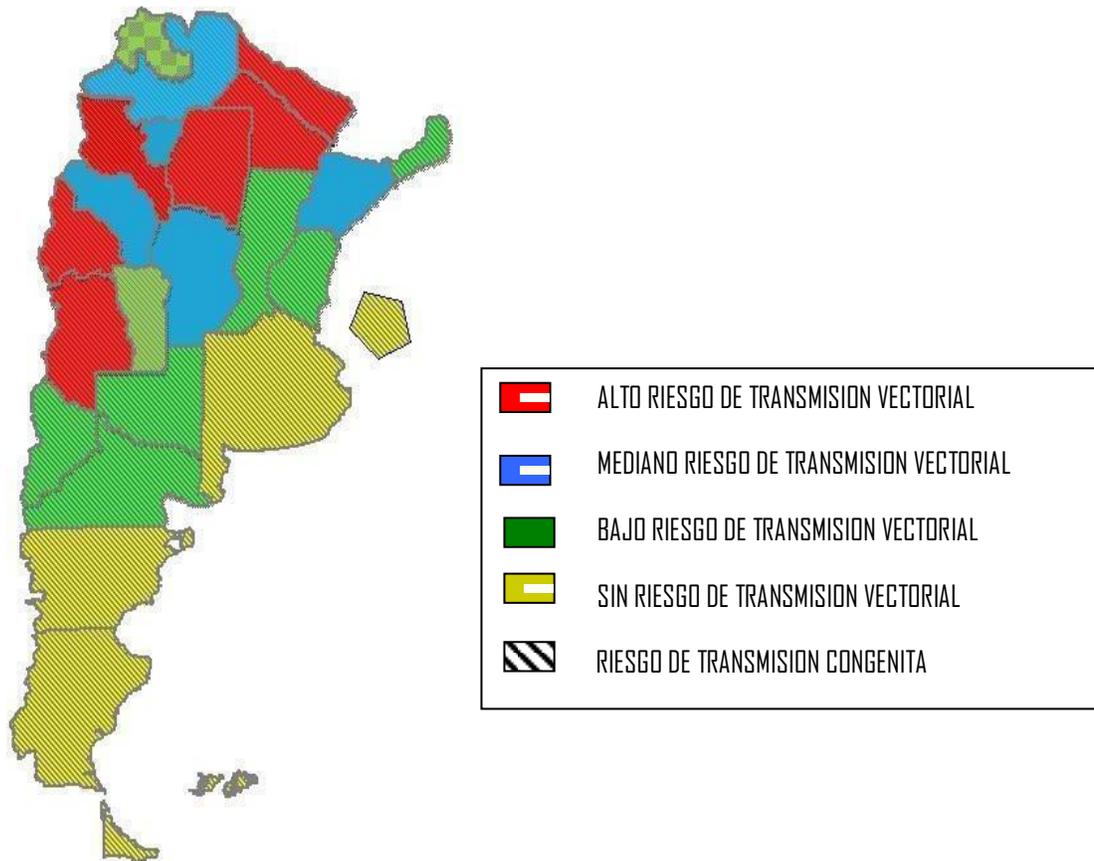


Figura 3: Situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina.(Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud de la Nación)

El control vectorial involucra una serie de actividades que apuntan al control de la transmisión en las áreas endémicas, una estrategia integral incluye el tratamiento químico de las viviendas, el mejoramiento de las mismas y sus estructuras peridomésticas y la promoción de medidas de prevención en la comunidad (Guía para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. Programa Nacional de Chagas)

En nuestro país la situación epidemiológica es muy heterogénea y existen zonas de prevalencias muy elevadas, tal como se pudo determinar en un trabajo que realizamos en el año 2005 en la provincia de Santiago de Estero en pacientes que asistieron al tren sanitario

“Dr. Ramón Carrillo”, en este estudio se halló una prevalencia global de seroreactivos a *T. cruzi* de 26%, según el sexo la seroprevalencia fue de 41% para hombres y de 21% para mujeres. Este trabajo se realizó con un número acotado de individuos (182 en total) en poblaciones alejadas de la capital provincial, con escasos recursos y viviendas precarias que serían las responsables de la endemia chagásica y de la prevalencia obtenida (De Marco y cols, 2005)

CICLO BIOLÓGICO DEL *T. cruzi*: (adaptado de www.cdc.gov)

El *Trypanosoma cruzi* es un parásito intracelular con un ciclo de vida que involucra vertebrados e invertebrados. Breve descripción del ciclo (figura 4)

- El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago infectado pica a un ser humano y defeca. El *T. cruzi* se encuentra en las heces del triatomino en un estadio con capacidad infectiva, llamado tripomastigote metacíclico, así los parásitos entran en el hospedero a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas.
- El tripomastigote metacíclico transmitido al hospedador vertebrado se observa en la sangre con forma de “S” o de “C” de 20 µm de largo por 1 µm de ancho. Durante esta etapa el parásito no se multiplica.
- Cuando el parásito ingresa a las células del músculo estriado o a los fagocitos se acorta el flagelo y se transforma en un amastigote redondo de 2 a 5 µm de diámetro, éste se multiplica por medio de fisión binaria formando “racimos” o “nidos” que se acumulan en la célula hasta que se rompe.
- Los parásitos liberados de la célula se convierten en promastigotes y tripomastigotes, que son liberados a la sangre circulante, son de un tamaño entre 15 y 20 µm, tienen flagelo libre, un kinetoplasto voluminoso terminal o subterminal que contiene el 30% del ADN de parásito y un núcleo oval. Estos tripomastigotes pueden infectar otras células pero no son capaces de multiplicarse en sangre (la única forma de multiplicarse en el vertebrado es la de amastigote intracelular) invaden otras células para repetir el ciclo.
- En el caso que un triatomino pique al hospedero, puede adquirir al parásito por ingestión de tripomastigotes sanguíneos.

- En el estómago del insecto los tripanosomas se transforman en epimastigotes.
- El parásito se reproduce por mitosis, los epimastigotes pasan al intestino del insecto
- Los epimastigotes se convierten en tripomastigotes metacíclicos y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo hospedador, repitiéndose el ciclo.

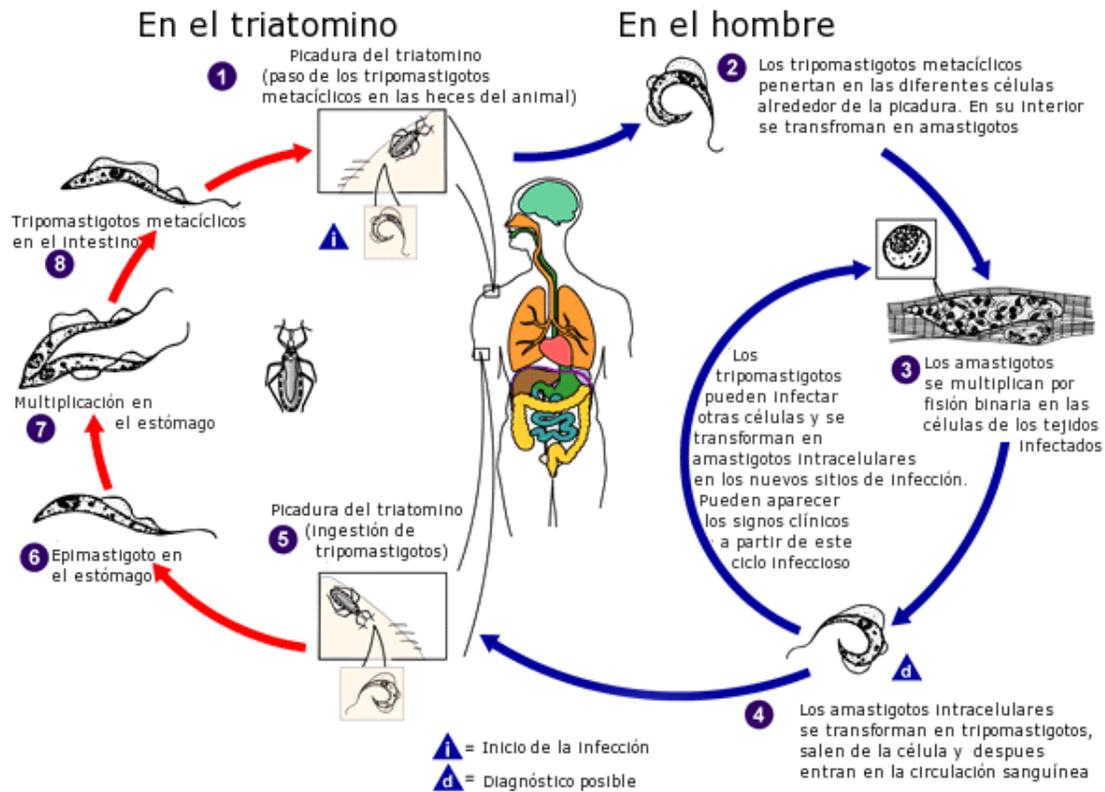


Figura 4: Ciclo biológico del *T. cruzi* (www.cdc.gov)

Diversidad genética de *T. cruzi*

La diversidad del genoma *T. cruzi* y la multiplicidad de sus genotipos y fenotipos es bien reconocida (Barnabé y col., 2000; Brisse y col., 2000; Devera y col., 2003). Actualmente, se asignan seis unidades discretas de tipificación (UTDs TcI a TcVI) (Zingales y col., 2009, 2012) las cuales constituyen unidades confiables para el análisis de la epidemiología molecular y estudios filogenéticos.

Tc I: Es el principal agente causal de la enfermedad de Chagas en el Amazonas. Están asociados con el ecotopo arbóreo. Sus vectores principales son *Rhodnius* y *Triatoma*. El principal reservorio son comadrejas (Coura y col., 2002; Roellig y col., 2008).

Tc II: Es el principal agente etiológico de Chagas en la región este y centro de Brasil (Lages-Silva y col., 2006). Se encuentra asociado al ciclo doméstico y peridoméstico. El principal vector es el *Panstrongylus* (Sturm y Campbell, 2010).

Tc III: Se lo encuentra principalmente en el ciclo silvestre terrestre. El reservorio más común es la mulita y los vectores son del género *Panstrongylus* y *Triatoma*. Ha sido aislado desde el norte de América del Sur hasta Argentina (Sturm y Campbell, 2010).

Tc IV: Se lo encuentra en la zona del Amazonas y en América del sur, se cree que podría tener un ecotopo arbóreo (Yeo y col., 2005). Los vectores son del género *Rhodnius*, *Panstrongylus* y *Triatoma*

Tc V: Es el principal causante de Chagas en Argentina, Paraguay, Bolivia, Chile y el sur de Brasil. Se encuentra asociado casi exclusivamente al ciclo doméstico y su principal vector es el *Triatoma infestans* (del Puerto y col., 2010; Diosque y col., 2003).

Tc VI: Se encuentra en el ciclo doméstico y peridoméstico, comparte regiones geográficas con el Tc V, se ha asociado a infección de perros y gatos (Cardinal y col., 2008)

Genotipo	Ecotopo/Nicho	Geografía	Enfermedad de Chagas
TcI	Primario: arbóreo palmeras (Attalea), huecos en árboles. Secundario: árido, rocoso terrestre en Amazonia	América del Sur, Central y del Norte	Norte del Amazonas, brotes orales Esporádico en el Cono Sur (región del Gran Chaco) Cardiomiopatía Meningoencefalitis asociada a SIDA
TcII	No se conoce completamente, raro en ciclos silvestres	Cono Sur, esporádico en el Norte	Brasil Atlántico y Central. Cardiomiopatía, megasíndromes digestivos
TcIII	Terrestre, fosorial	América del Sur	Raro en humanos (también en perros domésticos). Casos agudos en la Amazonia brasilera. Presentación clínica desconocida
TcIV	Arbóreo, y algunos hospederos terrestres en Norteamérica	América del Sur y del Norte	Causa secundaria de enfermedad de Chagas en Venezuela, esporádico en el resto de América del Sur
TcV	Raro en ciclos silvestres	Cono Sur, Gran Chaco, extremo sur de Brasil	Cono Sur Cardiomiopatía, megasíndromes digestivos. Transmisión vectorial y congénita
TcVI	Raro en ciclos silvestres	Cono Sur, Gran Chaco	Cono sur. Cardiomiopatía, megasíndromes digestivos

Tabla 1: Unidades discretas de Tipificación de *Trypanosoma cruzi* (Zingales y col, 2012).

Recientemente se ha descrito un linaje de *T. cruzi* que sería exclusivo de murciélagos (Pinto y col., 2012) el cual podría asignarse como UTD VII (Barnabé y col., 2016).

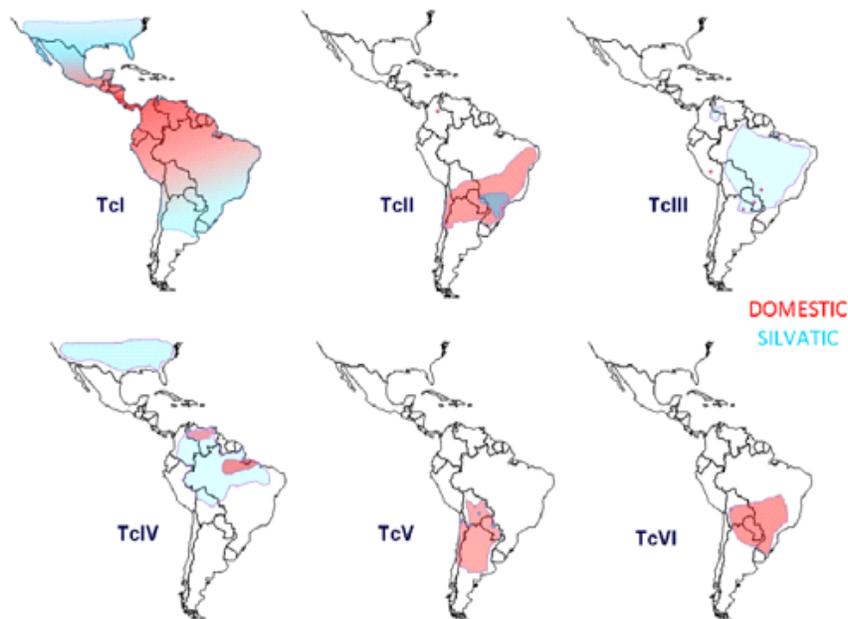


Figura 5: Distribución de los UTDs de *T. cruzi* en los ciclos silvestre y doméstico. (Tomado de Zingales y col, 2012).

ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas tiene dos fases: la fase aguda y la fase crónica. Ambas fases pueden ser asintomáticas o ser potencialmente mortales.

La fase aguda tiene lugar en las primeras semanas o los primeros meses de la infección. Generalmente pasa desapercibida porque no muestra síntomas o exhibe solo signos y síntomas leves que no son exclusivos de la enfermedad de Chagas. Los síntomas que nota el paciente pueden incluir fiebre, fatiga, dolor en cuerpo, dolor de cabeza, sarpullido, pérdida de apetito, diarrea y vómito. Los signos detectados en la exploración física pueden incluir agrandamiento leve del hígado o el bazo, inflamación de los ganglios e inflamación local (un chagoma), en el lugar por donde el parásito entró en el cuerpo. El marcador más reconocido de la enfermedad de Chagas en su fase aguda se conoce como signo de Romaña (figura 6), el cual incluye inflamación del párpado en el lado de la cara cerca de la herida dejada por la picadura o donde fueron depositadas las heces del insecto, las cuales pueden haber entrado al ojo por accidente si el paciente se restregó la cara. Aún si los síntomas aparecen durante la fase aguda, por lo general, desaparecen por sí solos, en unas cuantas semanas o meses. A pesar de que los síntomas desaparecen, la infección persistirá si no se lo trata. En muy pocas ocasiones, los niños pequeños (<5%) mueren por inflamación o infección grave del músculo cardíaco (miocarditis) o del cerebro (meningoencefalitis). La fase aguda también puede ser grave en las personas con sistemas inmunitarios debilitados. (www.cdc.gov)



Figura 6: El signo de Romaña. (CDC)http://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/index.html

En el caso de Chagas congénito frecuentemente es asintomático, o bien presenta signos y síntomas inespecíficos, pudiendo manifestarse incluso antes del nacimiento (abortos y muerte fetal), se han descrito casos de bebés prematuros con grave compromiso del estado general, hepatoesplenomegalia, insuficiencia cardíaca, meningoencefalitis, anemia, hiperbilirrubinemia, infecciones asociadas y elevada mortalidad (Saleme y col., 1971)

Después de la fase aguda de la infección, la enfermedad de Chagas no tratada entra en una fase crónica, inicialmente con una forma asintomática o indeterminada. Posteriormente, el 20-30% de los pacientes desarrollan alteraciones cardíacas, un 10% alteraciones digestivas o ambas y menos del 5%, alteraciones neurológicas. El resto permanecerá en la forma indeterminada, sin ningún tipo de manifestaciones clínicas durante toda su vida. (Pinto Días, 1995).

Pacientes inmunocomprometidos

Existen dos posibilidades que pueden suceder en un paciente inmunocomprometido: que una infección crónica se reactive, o que adquiera una infección aguda por diferentes vías de transmisión. En ambas circunstancias, el cuadro clínico es muy grave y requiere un rápido diagnóstico para que el tratamiento etiológico sea efectivo y para evitar complicaciones asociadas. En las formas agudas o reagudizadas en pacientes inmunodeficientes, las manifestaciones más frecuentes son el síndrome febril prolongado y las neurológicas (meningoencefalitis y/o granuloma cerebral); le siguen las manifestaciones cardiológicas (miocarditis, arritmias, insuficiencia cardíaca) y pueden observarse también en pacientes trasplantados cardíacos lesiones como la paniculitis aguda en brazos, piernas y abdomen. (Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosomacruzi*. Ministerio de Salud de la Nación, 2012.)

En un trabajo realizado en el Hospital Posadas se presentaron 5 casos de reactivación chagásica en SNC en pacientes inmunocomprometidos, en el que se concluye la importancia de realizar el diagnóstico diferencial en forma temprana entre toxoplasmosis, linfoma primario y chagoma cerebral, ya que no existen neuroimágenes patognomónicas

de chagoma, se propone un algoritmo para el diagnóstico precoz que podría reducir la mortalidad ante la reactivación de la Enfermedad de Chagas y se alienta al uso de metodologías de PCR, que podrían anticipar el diagnóstico cuando la parasitemia es negativa (Cabaleiro y col., 2015).

TRATAMIENTO

El tratamiento tripanocida en la fase aguda (vertical, vectorial, transfusional o postransplante) reduce la gravedad de los síntomas y acorta el curso clínico y la duración de la parasitemia detectable. La cura parasitológica (demostrable por negativización de la parasitemia y de la serología) es superior al 80% en fase aguda vectorial y más del 90% en los casos congénitos tratados durante el primer año de vida. En el caso de reactivaciones en pacientes con infección por VIH, que conlleva una alta mortalidad, el tratamiento tripanocida administrado en forma temprana mejora el pronóstico. En pacientes trasplantados con reactivación, la terapia tripanocida anticipada (tratamiento de pacientes con parasitemia patente sin síntomas de reactivación) y el tratamiento precoz de la reactivación con síntomas reduce la morbilidad y mortalidad asociadas. En niños y adolescentes con infección crónica, el tratamiento tripanocida es en general bien tolerado y ha demostrado una alta tasa de curación de la infección, demostrable por la negativización de la serología. Todas las guías y recomendaciones actuales coinciden en indicar que los niños y adolescentes con Chagas crónico deben ser tratados lo más precozmente posible dado que presentan menos efectos adversos y mejor respuesta terapéutica. Un beneficio adicional del tratamiento en esta población sería la reducción subsecuente del riesgo de Chagas congénito en la descendencia de las niñas tratadas y el aumento del número de potenciales donantes de sangre y órganos. (Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*. Ministerio de Salud de la Nación, 2012)

En los últimos años, se ha ampliado la indicación del tratamiento etiológico de la infección por *Trypanosoma cruzi* a pacientes infectados que cursan la fase clínica indeterminada o asintomática, a fin de procurar su curación y/o prevenir el desarrollo de la enfermedad (Sosa Estani y col., 1999) aunque la tasa de curación observada es menor que en niños y el tiempo requerido hasta la seroconversión es mucho mayor. Adicionalmente, el

tratamiento tripanocida en adultos menores de 50 años con infección crónica y con lesión cardiológica incipiente reduciría la progresión a estadios clínicos más avanzados (Viotti y col., 2006), aunque los resultados recientes del estudio prospectivo randomizado BENEFIT no encontraron asociación entre la respuesta parasitológica al tratamiento y la progresión clínica (Morillo y col., 2015).

Desde principios de 1970, solamente el Benznidazol y el Nifurtimox son los fármacos aprobados por la autoridad sanitaria para ser administrados con el fin antes señalado. Al mismo tiempo que su efectividad, en diferentes países, han sido bien descritos los efectos adversos producidos por dichos fármacos (Castro y col., 1988; Sosa Estani y col., 1998). La duración del tratamiento recomendada es de 60 días.

DIAGNÓSTICO

La primera fase de la enfermedad, la fase aguda, se caracteriza por una parasitemia elevada, detectable por métodos parasitológicos directos. La parasitemia desciende paulatinamente y se instaura la fase crónica (asintomática o sintomática), fase en la cual la parasitemia persiste, pero es difícilmente detectable. En esta fase hay una elevada producción de anticuerpos específicos de tipo IgG (inmunoglobulinas G) que son fácilmente detectables por técnicas serológicas. Estos anticuerpos, en la mayoría de los pacientes, estarán presentes durante toda la vida. (Murcia y col., 2013).

Métodos parasitológicos directos

La confirmación de la infección en fase aguda de primera elección es demostrar la presencia del parásito por métodos parasitológicos directos. Entre estos, los métodos de concentración en una muestra de sangre son los indicados y pueden ser realizados en laboratorios de baja complejidad. Los métodos que pueden utilizarse, en orden de menor a mayor complejidad son:

- **Gota fresca:** examinación microscópica de una gota de sangre fresca anticoagulada permitiendo la observación del rápido movimiento del tripomastigote de *T. cruzi*. Es

necesaria la examinación de por lo menos 100 campos microscópicos para llegar a la conclusión de la ausencia de los parásitos.

- **Micrométodo con capilares:** (Técnica de microhematocrito) se emplea en recién nacidos, cuando se dispone de poca sangre; consiste en colocar la sangre en uno o más capilares heparinizados, y someterlos a centrifugación en la microcentrífuga. En la interfase entre el empaquetado de hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos, en la que se observan los movimientos del flagelado al microscopio con ocular de 10x y objetivo de 40 aumentos. Alternativamente, se puede cortar el capilar en la interfase y poner el contenido sobre un portaobjetos para realizar la observación al microscopio como si fuese examen en fresco. Ha sido demostrada la mayor sensibilidad y rapidez en la detección del *T. cruzi* por microhematocrito con respecto a la gota fresca (Freilij y col., 1983).
- **Micrométodo con microtubo:** (De Rissio y col., 2009) Es la técnica utilizada en el Hospital Prof. A. Posadas, en reemplazo del microhematocrito, ya que evita los riesgos de lesión al cortar los capilares de vidrio para las muestras de sangre. Se colecta sangre anticoagulada en tubos eppendorf de 2 ml se realiza centrifugación y luego se observan 12 gotas de sangre de la interfase entre porta y cubreobjetos en aumento de 40x.
- **Strout:** (Strout, 1962), consiste en la colecta de sangre (mínimo 3,0 ml) sin anticoagulante, dejando el tubo a 37°C durante dos horas para la debida formación y retracción del coágulo. Si existen parásitos, migrarán para fuera del coágulo. El suero exudado se transfiere a otro tubo, el que se centrifuga suavemente (5 min a 50 g, aproximadamente 400 rpm), de lo cual queda un sobrenadante más claro, que se transfiere a un segundo tubo y se somete a centrifugación, ahora intensa (10 min a 400 g, aprox. 2.000 rpm). El sobrenadante, constituido por suero límpido, se desprecia y se hace una preparación en fresco del sedimento.

En casos de pacientes con inmunodeficiencia con síntomas neurológicos, también se debe buscar la presencia de parásitos en líquido cefalorraquídeo.

Métodos parasitológicos indirectos

Los métodos indirectos parasitológicos son los menos utilizados ya que requieren mucho tiempo, personal altamente especializado y un laboratorio adecuado. Solo se utilizan en centros de referencia, éstos permiten la multiplicación de los parásitos de la muestra. A continuación una breve descripción de los mismos:

- **Xenodiagnóstico:** este método se basa en la amplificación del parásito dentro del vector alimentado con sangre del paciente. Se utilizan ninfas de triatominos no infectados y la observación al microscopio del contenido intestinal se realiza entre 30 y 45 días después de la ingestión. La sensibilidad del método durante la fase crónica puede llegar al 60% (Portela-Lindoso y col., 2003).
- **Hemocultivo:** consiste en cultivar muestras de sangre del paciente. Los cultivos son analizados al microscopio a los 20, 30 y 45 días buscando formas epimastigotes (Chiari y col., 1999). En la fase aguda, su sensibilidad puede alcanzar el 100%. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico, pero permite aislar más fácilmente cepas del parásito.
- **Inoculación en animales sensibles:** se utiliza principalmente ratones o cobayos, se los inocula con sangre del paciente tratada con anticoagulantes o con la porción de la “capa blanca”. El período de observación de la sangre del animal es a partir de 3-4 semanas.

La seroconversión positiva entre dos análisis con 30 a 90 días de intervalo puede también servir como diagnóstico confirmatorio de fase aguda si no puede realizarse la parasitemia. Sin embargo, se debe recordar que la seroconversión tiene menor valor en el diagnóstico de fase aguda en pacientes con tratamientos o enfermedades que generen inmunosupresión o inmunodepresión.

Diagnóstico de Chagas congénito

En la figura 7 puede observarse el algoritmo para el estudio de Chagas congénito recomendado por el Ministerio de Salud de la Nación, en donde se indica que todas las embarazadas deben ser estudiadas serológicamente. El niño recién nacido, hijo de madre

infectada se estudiará en las primeras semanas de vida por métodos parasitológicos. Los niños que tuvieran una técnica parasitológica negativa en las primeras semanas, deberán tener un estudio serológico con 2 técnicas a partir de los 10 meses de edad.

Esquema diagnóstico y terapéutico del Chagas congénito

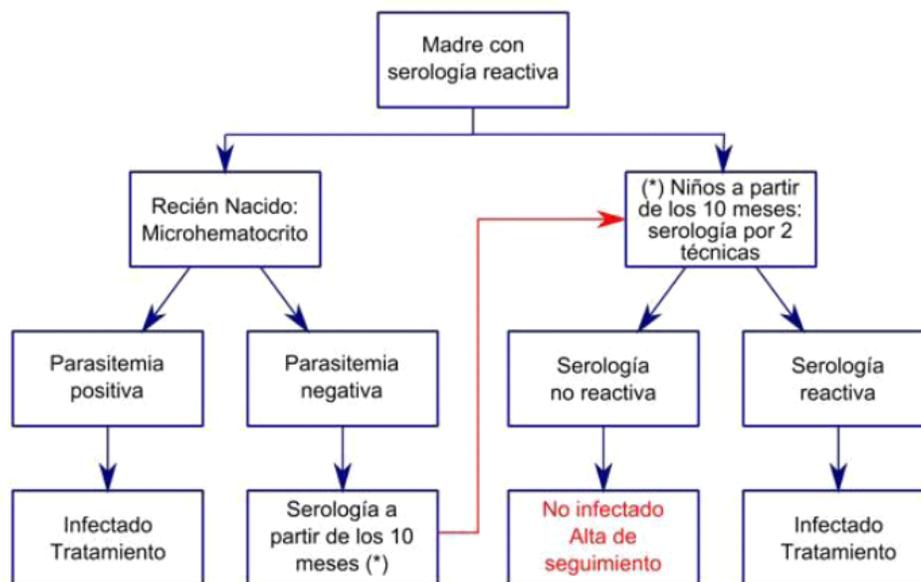


Figura 7: Algoritmo para el estudio de Chagas congénito y de menores de 1 año. Ministerio de salud de la Nación. (Guías para la atención del paciente infectado por *Trypanosoma cruzi*. 2012)

Diagnóstico de fase crónica

El diagnóstico de la fase crónica de la infección por *T. cruzi* se confirma al demostrar la respuesta inmunológica del hospedero frente al parásito. Para ello deberán realizarse al menos dos reacciones serológicas normatizadas de principios distintos que detecten antígenos diferentes. Ambas pruebas deben realizarse con la misma muestra de suero, siendo necesario además utilizar por lo menos una de las pruebas de mayor sensibilidad como enzimoimmunoensayo (ELISA) o inmunofluorescencia indirecta (IFI). Para considerar el diagnóstico como definitivo (ya sea confirmando o descartando una

infección crónica) el resultado de ambas pruebas debe ser coincidente (ambas reactivas o ambas no reactivas). En caso de discordancia (una prueba reactiva y otra no reactiva) se deberá realizar una tercera prueba, o derivarla a un centro de referencia.

Se debe tener presente que el valor diagnóstico de las pruebas serológicas debe interpretarse con cuidado en las siguientes situaciones:

- Inmunodepresión o inmunosupresión que compromete o anula la respuesta inmunológica del hospedero, lo cual puede conducir a un resultado falsamente no reactivo.
- Luego de completado el tratamiento tripanocida. En este caso, la respuesta inmunológica puede persistir por años luego de eliminado el parásito, por lo que un resultado serológico reactivo no significa fracaso terapéutico ni persistencia de la infección crónica.

Técnicas serológicas: (Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* Ministerio de Salud de la Nación, 2012)

- Ensayo inmuno-enzimático (ELISA).
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- Hemoaglutinación indirecta (HAI).
- Aglutinación con partículas de gelatina.
- Quimioluminiscencia

No existe una metodología universal para todas las etapas de la enfermedad. Porrás y colaboradores han comunicado la necesidad de contar con un sistema de diagnóstico de Chagas integrado a la atención médica de rutina para casos de transmisión congénita (como el estudio metabólico de pesquisa neonatal), para casos de transmisión vectorial o alimentaria, para pacientes inmunesuprimidos con reactivación chagásica, para donantes, etc. que sea capaz de detectar al parásito en forma rápida, sensible, específica, idealmente “point of care” o que no requiera cadena de frío para su derivación (Porrás y col, 2015) para esto se está trabajando en la estandarización de nuevas tecnologías como citometría de flujo, amplificación isotérmica, el uso de técnicas basadas en nanopartículas, o la PCR en tiempo real, entre otras.

Needs for Diagnosis	Medical Conduct	Samples and Sampling	Infrastructure	Technical Skills	Testing Site, Turnaround Time	Reading	Taxonomic Diagnosis	Sensitivity	Specificity
Congenital transmission	Serodiagnosis of pregnant women and women admitted at delivery living or born in endemic countries (knowing that >70% have no signs or symptoms)	Samples processed individually. (i) Maximum. 2 ml of cord or peripheral blood obtained specifically for diagnostic test; (ii) Blood sample collected for routine screening for infectious or metabolic diseases; (iii) Ideal: urine sample	(i) Ideal: processing at point of care; (ii) Less desirable: samples processed in a reference laboratory transported without cold chain	Good laboratory practices (GLP)-trained technical staff with quality certification. Screening conducted by staff who assisted the childbirth	Primary health centre (PHC), hospital or delivery institution. Ideal timing: <1 h, up to a maximum of 12 h from sampling	Qualitative	Single universal test should detect all circulating strains	>95%	100%. Ideal: integrated into routine health care screening (e.g., metabolic screening)
Vector and oral transmission	(i) Differential diagnosis for at risk population with febrile syndrome; (ii) Active search in cases of possible exposure (contacts)	Samples processed individually. (i) 2–5 mL blood or serum; (ii) Ideal: urine, saliva sample	(i) Ideal: processing at point of care; (ii) Less desirable: samples processed in a reference lab and transported without cold chain	GLP-trained technical staff with quality certification	PHC and/or community-based diagnosis facility. Ideal timing: <1 h from sampling	Qualitative/quantitative	Single universal test should detect all circulating strains	>95%	100%. Ideal: integrated into routine health care screening (e.g., metabolic screening). Should differentiate <i>T. cruzi</i> from <i>T. rangeli</i>
Reactivation of infection associated with immune suppression in organ transplants. Blood transfusion transmission	Active surveillance	Samples processed individually. Blood, cerebral spinal fluid, tissue from chagoma	(i) Ideal: processing at point-of-care; (ii) Less desirable: samples processed in a reference laboratory and transported without cold chain	GLP-trained technical staff with quality certification	Reference medical facility, blood banks, and hospital. Ideal timing: <1 h from sampling	Qualitative/quantitative	Single universal test should detect all circulating strains	>95%	100%. Ideal: integrated into routine screening. Should differentiate between <i>T. cruzi</i> and <i>T. rangeli</i> . In the case of diagnosis in central nervous system manifestations of HIV/AIDS, it should differentiate <i>T. cruzi</i> from other opportunistic infections, such as toxoplasmosis.

doi:10.1371/journal.pntd.0003697.t001

Needs for Diagnosis	Medical Conduct	Samples and Sampling	Infrastructure	Technical Skills	Testing Site, Turnaround Time	Reading	Taxonomic Diagnosis	Sensitivity	Specificity
Asymptomatic infected patients, referred symptomatic individuals, and positive blood donors	Active search in endemic/nonendemic and remote areas; prenatal screening	Samples processed individually. Ideal: saliva/urine; Alternative: whole blood, plasma or serum	Point of care, including community-based facility external to health center (no transportation required)	Adequately trained technical staff or community works with minimum quality certification standards	PHC and community setting (home, school, or community center); Ideal timing: <1 h from sampling	Qualitative	Single universal test should detect all circulating strains	Equal to or greater than standard serological tests	100%. No cross-reaction with other parasites (e.g., Leishmania, <i>T. rangeli</i>)

doi:10.1371/journal.pntd.0003697.t002

Figura 8: Diagnóstico de Chagas en el Sitio de Atención primaria de pacientes con distintas situaciones clínicas. Tomado de Porrás y cols. (2015)

Diagnóstico molecular

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica que permite la amplificación de fragmentos de ADN del parásito. La elección de la secuencia a amplificar y la metodología a utilizar son fundamentales para poder desarrollar un ensayo con alta especificidad y sensibilidad. Entre los protocolos de PCR más utilizados para el diagnóstico molecular de la Enfermedad de Chagas se encuentran la PCR para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* (Avila y col., 1991; Sturm y col., 1989) y la PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (sat-DNA) (Moser y col., 1989). Estas técnicas se basan en la amplificación de secuencias repetitivas y específicas del ADN del parásito. La primer PCR amplifica un segmento altamente conservado de 330 pares de base del minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi*. El ADN de kinetoplasto (k-DNA), es una condensación de ADN extra nuclear que representa entre el 20- 30% del ADN total del parásito. Está formado por una red de moléculas circulares: maxicirculos y minicirculos. Cada parásito tiene cerca de 30.000 minicírculos y cada minicírculo tiene cuatro pares de segmentos amplificables. Por lo tanto cada organismo tiene aproximadamente 120.000 copias amplificables de la secuencia diana. En el procedimiento descrito por Moser y col., se amplifica una secuencia de 188 pares de base de ADN nuclear repetitivo, de los cuales cada parásito tiene cerca de 100.000 copias. (Figura 8) En términos de especificidad, por otra parte, los ensayos basados en estos dos pares de cebadores no dieron resultados positivos falsos con los ADN de varias especies de mamíferos y de triatomíneos, así como de una variedad de microorganismos infecciosos incluyendo protozoos. (Kirchhoff y col., 2003)

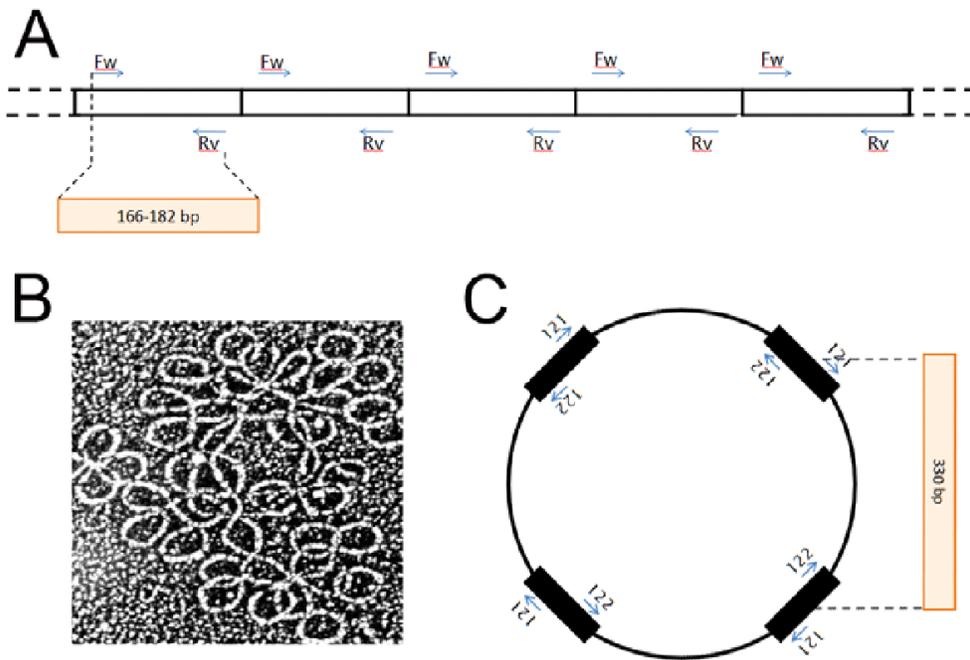


Figura 9: Blancos de amplificación para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* mediante PCR.
 A. Esquema de las repeticiones en tandem del ADN Satélite,
 B. Microscopía electrónica de la red de minicírculos del kinetoplasto,
 C. Esquema de un minicírculo con sus cuatro regiones variables (línea simple) y 4 conservadas (cuadros negros)

Existen en la bibliografía varias publicaciones en las que se ha demostrado que las técnicas moleculares presentaron mayor sensibilidad que las metodologías convencionales tanto para casos de infección congénita (Lucero y col., 2007; Mora y col., 2005), como para Chagas agudo (Winckler y col., 1997; Ferrer y col., 2012) y en pacientes con reactivación de la enfermedad (Brito y col., 1995; Diez y col., 2007). Sin embargo, la aplicación de la PCR en el análisis de muestras de pacientes con sospecha de infección chagásica ha revelado una alta disparidad de resultados, dependiendo de las características eco-epidemiológicas de las poblaciones estudiadas, el volumen de sangre recolectado, las condiciones de conservación y transporte de la muestra, los métodos empleados para purificar el ADN, las secuencias del parásito elegidas como blanco de amplificación, las secuencias de los iniciadores de PCR y sondas en el caso de los sistemas en tiempo real, los reactivos utilizados en la mezcla de reacción como así también las condiciones de ciclado. La Tabla 2 refleja la variabilidad de resultados de PCR en distintos estudios. Parte de las diferencias en la sensibilidad clínica reportadas puede deberse a la presencia intermitente de

carga parasitaria detectable en sangre en pacientes infectados en el momento de la toma de muestra, lo que es particularmente apreciable en los casos crónicos.

Estudio	País	Volumen	Muestra Conservante	Nro de pacientes	Fase de la infección	Edad	Purificación del ADN	Método Co/TR	Método de PCR Blanco	Sensibilidad %	Especificidad %	Referencia
1	Brasil	4ml	EDTA	18	D-A	51	IH	Co	ADNSat	93,3	100	Baista y col., 2010
2	Bolivia	12 ml	coagulo-20°C	143	C	53,7	IH	Co	ADNk	43	99,3	Hidron y col., 2010
3	Venezuela	10 ml	GEB	106	Agudo	SD	IH	Co	ADNk	19,5	100	Alarcón de Noya y col., 2010
4	Bolivia	SD	coagulo-20°C	138	A	SD	IH	Co	ADNk	63	99,3	Bern y col., 2009
5	Colombia	SD	angre de cordón-20°C	9	Neonatos					67		
		10 ml	GEB	20	crónica	SD	IH	Co	ADNk	70	100	Ramírez y col., 2009
6	Brasil	5 ml	GEB	50	A	38	IH	Co	ADNSat	75	100	
			capa de blancos	240						69,2	100	Fernandez y col., 2009
			capa de blancos	240						86,7	100	
Sangre periferica	7	Brasil	SD	9	Agudo	SD	SD	Co	ADNSat	100	100	Liate y col., 2009
		5 ml	EDTA	370						40	100	
8	Perú	5 ml	capa de blancos	137	SD	26,4	IH	Co	ADNk	46,5	100	Fitzwater y col., 2008
		5 ml	coagulo-20°C	168						60,1	100	
9	Colombia	5 ml	EDTA	67	A-C	SD	Kt	Co	Site	88	92,5	Glycol., 2007
10	España		capa de blancos	144	SD	SD	Kt	TR	ADNSat	41	100	Piron y col., 2007
11	Brasil	SD	GEB	234	A-C-D	SD	IH	Co	ADNk	1,2	100	Duarte y col., 2006
12	Argentina	4 ml	GEB	80	SD	52	IH	Co	E13	19,3	85	Salomona y col., 2003
13	Argentina	2 ml	GEB	33	neonatos	0,2			ADNk	100	97	Schijman y col., 2003
14	Bolivia	1 ml	GEB	41	A	63	IH	Co		74	100	
15	Brasil	10 ml	GEB	30	neonatos	SD	IH	Co	ADNSat	100	100	Versira y col., 2003
16	Brasil	10 ml	EDTA	10	A-C-D	SD	IH	Co	ADNSat	86	100	Marcon y col., 2002
17	Chile	1 ml	GEB	78	A	6			ADNk	100	100	Solari y col., 2001
				75	A	Adultos	IH	Co		69,3		
18	Venezuela	-	biopsia gingival	SD	Infección oral	44--12	SD	Co	ADNk	31	100	Añez y col., 2011
Tejidos	19	Argentina	-	6	C	50,9	Kt	Co	ADNk	75,7	100	Schijman y col., 2004
20	Brasil	-	biopsia cardiaca esciágo	3	D	53,9	IH	Co	ADNk	69,2	100	Lagas - Silva y col., 2001

Dg, Diagnóstico para la infección por T. cruzi. NEG, negativo. POS, positivo. TR, tiempo real. Co, Convencional. C, crónica con sintomatología cardíaca. A, crónica asintomática. D, crónica con sintomatología digestiva. SD, sin datos. IH, procesamiento casero. Kt, procesamiento comercial. ADNk, ADN del minicirculo del kinetoplasto. ADNSat, ADN satélite

Tabla 2: Estudios de sensibilidad y especificidad de métodos de PCR para la detección de *T.cruzi* en muestras de sangre periférica y tejidos tomados de la literatura, previos a la estandarización internacional de la PCR para *T.cruzi* promovida por TDR-OMS

Esta falta de estandarización de la técnica, ha hecho poco fiable la comparación de resultados entre distintos laboratorios y por lo tanto la utilidad de pruebas de PCR para el diagnóstico de enfermedad de Chagas ha sido un tema controvertido (Britto, 2009; Brasil y col., 2010, Schijman y col, 2011). En este contexto, varios investigadores de todo el mundo representados en organizaciones internacionales como OMS y OPS han reconocido la necesidad de estandarizar y validar en estudios multicéntricos los ensayos basados en técnicas de amplificación génica, de contar con protocolos operativos estandarizados (POEs) y con controles de calidad adecuados, además de simplificar los ensayos de PCR para acercar las herramientas moleculares al diagnóstico de los pacientes y el control de la enfermedad de Chagas (Schijman A.G. y col., 2014). Con el propósito de elaborar un protocolo estandarizado del uso de la técnica de PCR, el Dr Schijman y equipo, coordinaron un estudio respaldado por la OMS, en el que participaron 26 laboratorios de 16 países (Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Estados Unidos y Holanda, entre otros) con el fin de seleccionar los mejores procedimientos de diagnóstico. Para evaluar las distintas técnicas disponibles de PCR para la enfermedad de Chagas, diseñaron un estudio ciego que consistió en preparar distintos paneles de muestras conteniendo diluciones seriadas de ADN de cepas de *Trypanosoma cruzi* pertenecientes a distintos linajes filogenéticos, muestras de sangre no infectada inoculada con parásitos cultivados in vitro y paneles de muestras de sangre de pacientes infectados con *Trypanosoma cruzi* e individuos no infectados que fueron enviadas a los laboratorios participantes. Los grupos participantes debían informar los resultados usando sus propios métodos y controles de calidad. Se informaron 48 métodos distintos de los que finalmente se eligieron los 4 mejores en base a los resultados de sensibilidad y especificidad, ya que lograban la detección de al menos 10 fg/ μ l para cada población de ADN, 0,5 equivalentes de parásitos/mililitro (eq. par / ml), una sensibilidad entre 83,3 a 94,4%, una especificidad del 85-95%, exactitud de 86,8 a 89,5% y el índice kappa de 0,7 -0,8. Los métodos elegidos fueron los siguientes:

- 1) Extracción por solventes seguido por PCR en tiempo real Sybr-Green dirigido a Sat-DNA
- 2) Extracción de ADN por solventes seguido por PCR convencional dirigida a sat-DNA

3) Extracción de ADN basado en la columna de fibra de vidrio seguido por PCR en tiempo real con tecnología TaqMan dirigido a sat-DNA

4) Extracción de ADN por solventes seguido por PCR convencional con sistema *hot-start* dirigido a k-DNA.

Estos cuatro métodos fueron evaluados en el laboratorio de coordinación en un subconjunto de muestras de sangre humana, lo que confirma el rendimiento obtenido por los laboratorios participantes. (Schijman y col., 2011).

PCR en tiempo real (PCR en TR)

Del inglés *real time PCR* es una variante de la PCR utilizada para amplificar y simultáneamente cuantificar el producto de amplificación. Para ello se adiciona un fluoróforo que, en un termociclador que albergue sensores para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, permita medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Mackay, 2004). Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación. La PCR en TR es utilizada para la cuantificación de patógenos en muestras biológicas, posee además alta sensibilidad y especificidad.

Duffy y colaboradores han diseñado una PCR en TR multiplex basado en la tecnología TaqMan para amplificar en una misma reacción ADN parasitario (ADN satélite) y ADN de un control heterólogo exógeno como control de amplificación interno, con el objetivo de cuantificar ADN satélite de *T. cruzi*. La amplificación del control interno permite descartar falsos resultados negativos de PCR debido a sustancias inhibitoras o pérdida de ADN durante el procesamiento de la muestra. El ensayo tiene un límite de detección de 0,70 eq. par / ml y un límite de cuantificación de 1,53 eq. par / ml a partir de la sangre tratada con Hidrocloruro de Guanidina 6M- EDTA 0,2 M, contaminada con epimastigotes de cultivo del clon CL-Brener de *T. cruzi*. Los resultados de este ensayo animan a su aplicación para la evaluación temprana de la infección por *T. cruzi* en los casos en los que los métodos serológicos no son informativos, tales como infecciones recientes por contaminación oral o transmisión congénita o luego de transplantes con órganos de donantes seropositivos, así como para seguimiento de los pacientes en tratamiento etiológico (Duffy y col., 2013).

Diagnóstico molecular de *T. cruzi* en el Hospital Prof. A. Posadas

En el Hospital Prof. A. Posadas hemos realizado un trabajo de puesta a punto y validación de las técnicas moleculares para aplicarlas al diagnóstico de Chagas determinando la sensibilidad analítica de las PCR convencionales, que resultó entre 0.5-1 eq. par / ml y se realizó una comparación de resultados por técnicas moleculares versus la metodología de observación microscópica (micrométodo) por personal altamente capacitado en muestras de pacientes recién nacidos (hijos de madres seropositivas para Chagas) y adultos con sospecha de reactivación chagásica por inmunosupresión. En ambas poblaciones se obtuvo una mayor capacidad de detección de la PCR respecto a la microscopía con una diferencia estadísticamente significativa (Irurtia y col, 2016). Se utilizó PCR con sistema *hot start* en muestras de sangre anticoagulada con EDTA y se procedió a la extracción de ADN con columnas comerciales de sílica gel.

A cada muestra se le realizaron 3 PCR convencionales (PCRc):

- I) PCR para secuencias del minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* (k-DNA), con iniciadores 121-122
- II) PCR para secuencias del ADN satélite nuclear de *T. cruzi* (sat-DNA), con iniciadores TC1-TC2
- III) PCR para secuencias del gen de la β Actina humana, utilizado como control endógeno de amplificación y extracción de ADN

Interpretación:

- Se consideró resultado positivo por biología molecular a aquellas muestras que dan las 3 PCR's positivas
- Se consideró resultado negativo por biología molecular a aquellas muestras que dan las PCR's I) y II) negativas y la PCR III) positiva
- Se consideró resultado discordante por biología molecular a aquellas muestras que dan las PCR's I) y II) diferente y la PCR III) positivo

- Se consideró resultado inválido por biología molecular a aquellas muestras que dan la PCR III) negativa

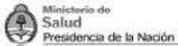
USO DEL PAPEL DE FILTRO COMO SOPORTE DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

El papel de filtro es ampliamente utilizado para almacenar y transportar diversos tipos de muestras de seres humanos, animales, y plantas. Casi todo tipo de fluidos del cuerpo humano (sangre, saliva, heces, leche materna, etc) ha sido colectado en papel de filtro para realizar ensayos bioquímicos, como la detección de mutaciones genéticas, la determinación de metabolitos por espectrometría de masas, el monitoreo de drogas, la detección de ácidos nucleicos, la detección de antígenos y de marcadores serológicos, entre otros (Smit y col., 2014). Robert Guthrie fue el primero en utilizar la sangre seca sobre papel de filtro para implementar el diagnóstico de fenilcetonuria en recién nacidos (Guthrie, 1963).

Uso del papel de filtro en el Programa Nacional de pesquisa Neonatal

La pesquisa neonatal es la búsqueda masiva en todo recién nacido de enfermedades congénitas inaparentes clínicamente al nacimiento. Es una herramienta de salud preventiva que permite la detección precoz de patologías que no presentan signos y síntomas específicos al nacimiento pero que si no son diagnosticadas y tratadas a tiempo causan daño severo e irreversible, incluso pueden producir la muerte del recién nacido. El Programa Nacional de Pesquisa Neonatal es obligatorio en Argentina por las Leyes nacionales 23.413 y 23.874 desde 1990 para todo recién nacido en el territorio nacional tanto en el ámbito público como privado (Manual de procedimientos del “Programa Nacional de Fortalecimiento de la Detección Precoz de Enfermedades Congénitas”, agosto 2011). Las enfermedades que son pesquisadas en nuestro país a partir de las muestras de sangre en papel de filtro son: fenilcetonuria, hipotiroidismo neonatal, fibrosis quística, galactosemia, hiperplasia suprarrenal congénita y deficiencia de biotinidasa. En el año 2007 bajo la ley 26.279 se extendió el estudio de la pesquisa a otras enfermedades que se pueden detectar al

nacer como la retinopatía del prematuro, Chagas, y Sífilis. Para la enfermedad de Chagas lo que se establece es el estudio de la mujer embarazada por serología y en caso de ser positiva, se debe estudiar al recién nacido realizando extracción de sangre venosa anticoagulada para la detección del *T. cruzi* por técnicas de visualización microscópicas y posteriormente la confirmación serológica (figura 7); no es utilizada la muestra del papel de filtro. Las tarjetas que se utilizan en el Programa de pesquisa neonatal (figura 10) permiten la correcta absorción de la sangre para realizar los estudios metabólicos estandarizados y la identificación fehaciente a del paciente para ser localizado en caso de ser necesario.

 <p>Ministerio de Salud Presidencia de la Nación</p>		<p>Dirección Nacional de Maternidad e Infancia PROGRAMA NACIONAL DE PESQUISA NEONATAL</p>		<p>(Espacio para N° de Serie, Código de Barras y N° de 6 dígitos)</p>	
<p>INSTITUCIÓN: CUJE: UUUU</p>		<p>INFORMACIÓN PARA EL LABORATORIO</p>		<p>ANTECEDENTES MATERNOs:</p>	
<p>RECÍEN NACIDO: Apellido:</p>		<p>Antibiótico: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>		<p>Tiroideopatías: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>Nombre:</p>		<p>Desinfectantes yodado: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>		<p>Otras:</p>	
<p>MADRE:</p>		<p>Transfusión: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>		<p>Dopamina / Dobutamina: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>Apellido: Nombre:</p>		<p>MUESTRA RECÍEN NACIDO:</p>		<p>(Espacio para N° de Serie, Código de Barras y N° de 6 dígitos)</p>	
<p>Documento: <input type="checkbox"/> DNI <input type="checkbox"/> Pasaporte <input type="checkbox"/> C.I. Nº</p>		<p><input type="checkbox"/> Primera <input type="checkbox"/> Repetición</p>		<p>PROGRAMA NACIONAL DE PESQUISA NEONATAL NO TOQUE LOS CÍRCULOS - LLÉNELOS COMPLETAMENTE (Papel Nº 000000-0000 - Incremento: 00606000)</p>	
<p>Domicilio:</p>		<p>REPETIR:</p>		<p>Fenilcetonuria: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>Localidad:</p>		<p>Hipotiroidismo: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>		<p>Hiperplasia suprarrenal: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>Departamento: Provincia:</p>		<p>Galactosemia: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>		<p>Biotinidasa: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>	
<p>Número de teléfono:</p>		<p>Fibrosis quística: <input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No</p>		<p>Medico Responsable:</p>	
<p>Tipo de teléfono: <input type="checkbox"/> propio <input type="checkbox"/> familiar <input type="checkbox"/> vecino <input type="checkbox"/> trabajo</p>		<p>Fecha y hora de nacimiento: / / a las :</p>		<p>Firma y sello:</p>	
<p>Fecha y hora de la extracción: / / a las :</p>		<p>Sexo: <input type="checkbox"/> masculino <input type="checkbox"/> femenino</p>		<p>RECÍEN NACIDO: <input type="checkbox"/> a término <input type="checkbox"/> prematuro</p>	
<p>Semanas de gestación: Gramos:</p>		<p>Alimentación: <input type="checkbox"/> pecho <input type="checkbox"/> biberón <input type="checkbox"/> parenteral</p>		<p>.....</p>	

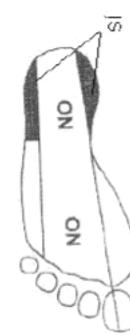
<p>Dirección Nacional de Maternidad e Infancia PROGRAMA NACIONAL DE PESQUISA NEONATAL</p> <p>Instrucciones para la toma de la muestra</p> <p>La muestra debe tomarse entre las 48 horas y el quinto día de nacimiento. Se recomienda un sangrado estéril en los casos de nacimientos prematuros. De no ser así, el hecho de haber sido recién nacido, no es suficiente para garantizar la calidad de la información que se le va a dar. Se debe evitar el uso de alcohol y permitir la evaporación. No use Polibron Yodada</p> <p>PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE UNA MUESTRA DEL SANGRE DEL TALÓN DE UNA MUESTRA DEL SANGRE DEL TALÓN</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Coloque la pinta del baxó en un nivel más bajo que el de su corazón. 2. Elija un lugar para la punción, en las zonas que indica el dibujo. 3. Desinfecte la piel con alcohol y permita su evaporación. No use Polibron Yodada 4. Puncie la piel con una lanceta esterilizada y con la punta no más larga que 2,4 mm. Utilice gasa esterilizada para limpiar la primera gota de sangre, ya que puede contaminarse con el desinfectante o fluidos del tejido. 5. Permita el flujo de la sangre para formar una segunda gota. 6. Aplique la gota de sangre directamente en el centro del círculo de papel de filtro. Llene cada círculo con una sola gota que alcance el papel de filtro. 7. NO AFLIQUE SANGRE EN AMBOS LADOS DEL PAPEL. Cada círculo debe quedar completamente lleno. 8. Dejar secar las muestras de sangre en posición horizontal y durante por lo menos 3 (tres) horas. Mientras se está secando, proteja las muestras y no las apile. 9. Verifique la información del paciente sobre el formulario. 10. Envíe la muestra al laboratorio correspondiente dentro de las 48 horas de su colección, de acuerdo con el circuito de derivación. <p>CONSULTAS: pesquisaneonatal@dnimhsalud.gov.ar (011) 4379-6020 / 4363-6799 - Int. 249</p> 
--

Figura 10: Tarjeta utilizada en el Programa Nacional de pesquisa neonatal (anverso y reverso), en la imagen superior del lado izquierdo se observan los datos a completar del paciente y del lado derecho se observan los

círculos donde se coloca la muestra de sangre; en la imagen inferior se detallan las indicaciones para la correcta toma de muestra.

Uso del papel de filtro para el diagnóstico de enfermedades infecciosas

Existen en la bibliografía numerosas publicaciones en las que utilizan este soporte de sangre para realizar estudios moleculares de enfermedades infecciosas, tanto congénitas como adquiridas, en el caso de las primeras, la muestra de sangre del recién nacido conservada sobre los papeles de filtro, es de gran utilidad para diferenciar infecciones adquiridas durante la gestación, de aquellas adquiridas luego del nacimiento, lo cual puede ser un dato de relevancia para el tratamiento, el pronóstico y la epidemiología de la enfermedad, tal es el caso del estudio molecular de Citomegalovirus (Boppana y col., 2010), de VIH (Uttayamakul y col., 2005), y del virus Herpes Simplex (Lewensohn-Fuchs y col., 2003). En los últimos años se ha incrementado el interés por evaluar la utilidad de los papeles de filtro aplicado al diagnóstico de enfermedades tropicales desatendidas (Smit y col., 2014). En el caso de la infección por VIH el uso de papeles de filtro ha sido extensamente estudiado y la Organización Mundial de la Salud recomienda su uso en países con recursos limitados para la toma de muestras y monitorización de la infección cuando la recogida de sangre por venopunción no es posible (Bertagnolio y col., 2010), los papeles de filtro han sido reportados como una metodología costo- efectiva en brotes por virus Chikungunya en zonas alejadas (Andriamandimby y col., 2013). Además de los virus, otros microorganismos causantes de infecciones en humanos han sido estudiados en muestras secas en papel de filtro; por ejemplo, en el diagnóstico de neumonía por *Streptococcus pneumoniae* (Steyn, 2010) y de meningitis por *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* en líquido cefalorraquídeo colocado en papeles de filtro (Peltola y col., 2010), en infecciones por parásitos como *Babesia* (Tani y col., 2008), *Brugia malayi* (Rahmah, col., 2010), *Plasmodium* (Hsiang y col., 2010; Carnevale 2002) para leishmaniasis visceral, (Campino y col., 2000) y *Trypanosoma congolense* y *T. brucei* en sangre bovina (Katakura y col., 1997).

En el contexto de la enfermedad de Chagas se han publicado trabajos de sangre entera colectada en papel de filtro para realizar estudios serológicos (Holguín y col., 2013;

Machado-Coelho y col., 1995). Recientemente ha salido una publicación en la que se incluye al papel de filtro como soporte para el estudio molecular de la infección por *T. cruzi* en una comunidad de alta endemicidad de la provincia de Chaco con resultados prometedores, resaltando la posibilidad de obtener una muestra sencilla y sin deterioro para su estudio posterior por técnicas moleculares (Sánchez y col., 2016) aunque aún no se ha estandarizado la metodología. La inclusión del estudio molecular de *T. cruzi* en el papel de filtro utilizado para pesquisa neonatal implicaría una oportunidad más en la detección de la transmisión vertical del parásito y aporta la posibilidad de utilizar un soporte de muestra práctico para la derivación y conservación de muestras. Los papeles de filtro almacenan poca cantidad de sangre, con lo que podría verse afectada la detección del ADN en pacientes con baja carga parasitaria. Es por ello que consideramos de gran importancia la evaluación de desempeño de esta metodología para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Siendo la enfermedad de Chagas una de las endemias más importantes en Latinoamérica y que afecta particularmente a las poblaciones más vulnerables, considero de vital importancia el aporte de la comunidad científica para colaborar en la detección de casos y así disminuir la tasa de transmisión. Con el algoritmo diagnóstico vigente (figura 7) se pierden entre el 50 y 70 % de oportunidades diagnósticas de Chagas congénito (Taller: transferencia de estrategias moleculares basadas en PCR para el diagnóstico de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi* en el sistema sanitario público nacional. Instituto Nacional de Parasitología. Dr. Mario Fatała Chabén, 2015) el motivo de estas pérdidas en el diagnóstico está relacionado a diversos factores:

- La baja sensibilidad de la técnica de visualización microscópica.
- El algoritmo actual considera una sola muestra para realizar el estudio directo (a mayor cantidad de muestras estudiadas más posibilidades de encontrar el parásito)

- La serología materna y la confirmación serológica de los bebés a partir de los 10 meses no siempre se realiza por motivos sociales, familiares, económicos, falta de comunicación efectiva entre agentes de salud, etc.

La incorporación de métodos moleculares aplicados al estudio de Chagas congénito aumenta las posibilidades diagnósticas, debido a la alta sensibilidad de la técnica. Es importante destacar que la respuesta terapéutica iniciada en los primeros meses de vida, tiene una eficiencia cercana al 100% garantizando curación clínica y parasitológica definitiva (Freilij y col., 1995), por lo tanto ese niño no padecerá la enfermedad y no desarrollará anticuerpos contra *T. cruzi*, evitando complicaciones a largo plazo, que pueden ir desde la muerte, las cardiopatías o la transmisión a las futuras generaciones, hasta la discriminación laboral y social o ser rechazado como donante de sangre y órganos, lo cual es perjudicial para él y para la sociedad. Además, en el caso de las niñas, el diagnóstico temprano seguido del tratamiento es una forma de prevención de la transmisión congénita de segunda generación.

En este trabajo se busca evaluar la posibilidad del uso de las muestras en papel de filtro para realizar un diagnóstico confiable y precoz de la enfermedad de Chagas, especialmente enfocado al recién nacido, sin la necesidad de realizar la extracción de sangre por venopunción y con la posibilidad de derivar muestras a centros de diagnóstico alejados sin requerimientos especiales para su traslado; aprovechando la estandarización de los protocolos del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal (“Programa Nacional de Fortalecimiento de la Detección Precoz de Enfermedades Congénitas”, agosto 2011). Se trabajó con el mismo papel de filtro utilizado en dicho programa y sobre éste se realizaron técnicas moleculares para la detección de *T. cruzi* en sangre. Con el fin de disminuir el número de casos de Chagas congénito que no son detectados, este trabajo aspira a aportar un mecanismo más en las oportunidades de diagnóstico. Su aplicación también puede ser de utilidad en niños o adultos que vivan en zonas alejadas a centros de diagnóstico, ya que facilitaría el transporte de la muestra desde cualquier punto del país a laboratorios con capacidad en técnicas moleculares, puesto que está ampliamente demostrado que este soporte conserva la muestra en condiciones adecuadas para realizar estudios de ADN (Chaisomchit y col., 2005; de Mulder y col., 2013; Smit y col., 2014).

Las ventajas de utilizar este tipo de soporte son:

- Las muestras de sangre en papel de filtro se utilizan en el Programa Nacional de Pesquisa Neonatal, que es obligatorio para todo bebé nacido en Argentina, con lo cual no sería necesario una nueva toma de muestra en los recién nacidos. Las muestras de los bebés son tomadas antes del alta de la maternidad y la tarjeta con la muestra puede ser enviada a un centro de mayor complejidad para realizar los estudios que correspondan.
- Las muestras se conservan durante largos períodos en heladera o freezer e incluso a temperatura ambiente en forma adecuada (Chaisomchit y col, 2005; Hollegaard y col, 2011)
- Son fácilmente transportables, no requiere condiciones especiales para su traslado
- Los requerimientos para la toma de muestras son mínimos: lanceta estéril y papel de filtro, no se necesitan jeringas, ni tubos, ni sistemas de refrigeración.
- Una vez tomada la muestra puede conservarse una porción en idénticas condiciones en el papel de filtro para ser utilizada luego como contramuestra
- Se utiliza poca cantidad de sangre, lo que es favorable en neonatos con baja volemia.
- Ocupan poco espacio durante su almacenaje
- Se pueden realizar estudios retrospectivos de enfermedades congénitas tanto infecciosas como no infecciosas en las muestras guardadas en los papeles de filtro del programa de pesquisa neonatal.
- Está reportado un menor potencial patogénico con respecto a las muestras líquidas para quien los manipula (Abdelwhab y col., 2011).

Las desventajas de utilizar este tipo de soporte son:

- La limitación en el volumen de las muestras que puede afectar la capacidad de detección en los pacientes con baja carga parasitaria.
- La presencia de componentes del papel de filtro que puedan interferir en las metodologías de amplificación

- La posibilidad de contaminación entre muestras contiguas, teniendo en cuenta que los procedimientos para análisis de pesquisa neonatal no fueron diseñados para técnicas de biología molecular

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la utilidad del papel de filtro del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal como soporte para el diagnóstico molecular de infección por *Trypanosoma cruzi* con el propósito de generar una oportunidad más en el diagnóstico temprano de Chagas congénito y como una alternativa simple para derivar o almacenar muestras de pacientes en los que se requiera estudio molecular de infección por *T.cruzi*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estimar la sensibilidad analítica de la PCRc para k-DNA en muestras de papel de filtro conteniendo ADN de *T. cruzi* en matriz sanguínea utilizando diferentes métodos de extracción

- 2) Comparar el desempeño de tres métodos de amplificación (PCRc k-DNA, PCRc sat-DNA y PCR en TR) aplicados a muestras de sangre contaminada con parásitos de cultivo en sangre líquida (sangre directa) y la misma muestra colocada en el papel de filtro.

- 3) Aplicar los ensayos de PCR para el diagnóstico molecular de la infección por *T. cruzi* en muestras de sangre impregnadas en papel de filtro de dos grupos de pacientes: bebés recién nacidos hijos de madres con serología positiva para Chagas y pacientes con riesgo de reactivación chagásica por inmunosupresión por tratamiento post-transplante, por coinfección con VIH u otras condiciones de inmunocompromiso

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales utilizados en los experimentos de la tesis:

- Papeles de filtro utilizados en el programa de pesquisa neonatal de la Dirección Nacional de Maternidad e Infancia (Ministerio de Salud de la Nación) Papel S&S 903.
- Kit de extracción de ADN Roche “High Pure PCR Template Preparation Kit”
- Tijera
- Sacabocados
- Alcohol 70 grados
- Hipoclorito de sodio 1 %
- Extrán neutro 5 %
- Kit de extracción de ácidos nucleicos “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Roche)
- Termobloque con agitador marca Eppendorf Thermomixer compact
- Microcentrífuga marca Eppendorf minispin plus
- Termociclador BioRad DNA Engine
- Cuba electroforética
- Transiluminador UV (Transiluminator UVP)
- Espectrofotómetro Nanodrop
- Tubos plásticos de 1.5 ml estériles libres de RNAsas, DNAsas y pirógenos
- Tubos plásticos de 0.2 ml estériles libres de RNAsas, DNAsas y pirógenos
- Reactivos: Cl_2Mg , dNTPs, Buffer, taq DNA polimerasa con sistema *Hot Start*, H_2O destilada calidad Biología Molecular
- Reactivos PCR en TR: Master mix comerciales “Roche” para PCR multiplex
- Sondas IAC y *T.cruzi* para PCR en TR mencionadas
- Cebadores para las pruebas de PCRc y PCR en TR mencionadas
- Pipetas automáticas: de 100- 1000 μ l, de 20- 200 μ l, de 10 - 100 μ l, de 2- 20 μ l, de 0.5- 10 μ l

- Tips estériles libres de RNAsas, DNAsas y pirógenos con filtro: de 200 µl, de 100 µl, de 10 µl y de 1000 µl
- Agarosa marca Conda
- Buffer TAE (Tris- Acético- EDTA) 1X marca Gibco ultrapura grado Biología Molecular
- Xilencianol
- Marcador de peso molecular de 100 a 1500 pb (invitrogen)
- Equipos de PCR en TR: (INGEBI)Rotor-Gene 6000 (Corbett, UK), Applied Biosystems (ABI 7500, USA)
- Sangre entera en EDTA con serología negativa para Chagas
- Medio de cultivo LIT (Liver Infusion- Tryptose)
- Cámara de Neubauer
- Microscopio óptico

MÉTODOS:

Protocolos de amplificación utilizados en la tesis

PCR convencional:

Técnica de PCR para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* (k- DNA) Para la detección de ADN de minicírculo de kinetoplasto de *T. cruzi* se utilizó el protocolo de Burgos y col (2007) que amplifica una banda de 330 pares de bases (pb) empleando los cebadores 121 y 122. Las condiciones de reacción fueron: Buffer 1X, desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP) 0.25mM, cebadores 2.5 µM, cloruro de magnesio 3mM y Polimerasa 0.75U (taq Platinum de Invitrogen con sistema Hot start) para un volumen final de mezcla de reacción de 25 µl y volumen de muestra de 5µl. La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: un ciclo inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 5 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 68°C y 45 segundos a 72°C, luego 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 64°C y 45 segundos a 72°C, finalmente a 72°C durante 10 minutos. (Burgos y col., 2007)

Cebadores	Secuencia
121	5'-AAATAATGTACGGGKGAGATGCATGA-3'
122	5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3'

Tabla 3: Cebadores y secuencias utilizadas en la amplificación de k-DNA

Técnica de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (sat-DNA). Se realizó la técnica de PCR para la detección de ADN satélite de *Trypanosoma cruzi* empleando los cebadores específicos diseñados para una PCR en tiempo real (Pirón y col., 2007) TC1 y TC2. Estos cebadores permiten la amplificación de una región repetida de 188 pares de bases del ADN satélite de *T. cruzi*. Las condiciones de reacción fueron: Buffer 1X, desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP) 0.25mM, cebadores 0.5 μ M, cloruro de magnesio 3 mM y Polimerasa 0.6 U (Taq Platinum de Invitrogen con sistema *Hot start*) para un volumen final de mezcla de reacción de 25 μ l y volumen de muestra de 5 μ l. La PCR se llevó a cabo mediante el siguiente programa: un ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 60 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C y 60 segundos a 72°C.

Cebadores	Secuencia
TC1	5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3'
TC2	5'-AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3'

Tabla 4: Cebadores y secuencias utilizadas en la amplificación de sat-DNA

Técnica de PCR para detección de ADN del gen control β -actina. Se utilizaron los siguientes cebadores: ACT forward y ACT reverse. Estos cebadores amplifican una secuencia de 550 pares de bases del gen de la β -actina que se expresa constitutivamente en todos los tejidos humanos. Para una mezcla de reacción de 25 μ l de volumen final se incluye: Buffer 1X, desoxinucleótidos tri-fosfato (dNTP) 0.2mM, cebadores 0.4 μ M, cloruro de magnesio 2,5 mM, Polimerasa 1 U y 5 μ l de volumen de muestra. Las condiciones de amplificación son: un primer ciclo de 45 segundos a 94°C, luego 35 ciclos

de 20 segundos a 94 °C, 10 segundos a 62 °C y 20 segundos a 72°C, y finalmente un ciclo de 45segundos a 72°C.

Cebadores	Secuencia
ACT forward	5'-GGACCTGACTGACTACCTCATGGA-3'
ACT reverse	5'-GATCCACATCTGCTGGAAGGTGG-3'

Tabla 5: Cebadores y secuencias utilizadas en la amplificación de β -actina

Para las tres técnicas de amplificación se utilizó el termociclador DNA *Engine* de BioRad (Disponible en el Servicio de Bioquímica, sector Microbiología Molecular del Hospital Prof. A. Posadas)

Electroforesis de ADN en geles de agarosa. La electroforesis se realizó en geles de agarosa (*Invitrogen*) al 2% utilizando Buffer TAE (Tampón Tris Acetato 40 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0) y un sistema de electroforesis horizontal (Bio Rad- Sub Cell GT). Los geles se tiñeron con 2.5 μ l/50 ml de bromuro de etidio. Previo a la siembra, las muestras de ADN fueron mezcladas con 0,2 volúmenes de tampón de siembra, que contiene Glicerina 60%; Azul de Bromofenol 0,25% y Xilencianol 0,25%. Se empleó un voltaje de 90V durante 45 minutos. Las bandas de ADN se visualizaron con transiluminador de luz ultravioleta. El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con un marcador de peso molecular de 100 pb (*Invitrogen*). Los geles fueron fotografiados y las fotos guardadas digitalmente.

PCR en tiempo real

Se utilizó el protocolo descrito por Duffy y colaboradores para la amplificación de ADN satelital y ADN IAC (control interno de amplificación) utilizando sondas TaqMan con los cebadores: *Cruzi Forward*, *Cruzi Reverse*, *IAC forward*, *IAC* y las sondas *Cruzi* y *IAC*. Los cebadores *Cruzi Forward* y *Cruzi Reverse*, se utilizaron en una concentración final de 0.75 μ M, los cebadores *IAC Forward* y *IAC Reverse* en una concentración final de 0.1 μ M

y las sondas en una concentración final de 0.05 μM , para un volumen final de 20 μl y un volumen de muestra de 5 μl . Las amplificaciones se llevaron a cabo en un equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett, UK) o en un equipo Applied Biosystems (ABI 7500, USA) en el INGEBI, con las siguientes condiciones de reacción: un primer ciclo de 2 minutos a 50°C, un segundo paso de 10 minutos a 95 °C y luego 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 58°C (Duffy y col., 2013).

Cebadores y sondas	Secuencias
Cruzi Forward	5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCGA-3
Cruzi Reverse	5' -AATTCCTCCAAGCAGCGGATA-3
IAC forward	5' -ACCGTCATGGAACAGCACGTA-3'
IAC reverse	5' -CTCCCGCAACAAACCCTATAAAT-3'
Sonda Cruzei	5' -Fam-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB-3'
Sonda IAC	5' -VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB-3

Tabla 6: Secuencias de cebadores y sondas utilizadas en la amplificación de *T. cruzi* por PCR en TR

Mezcla de reacción	Concentración	Volumen (μl)
Agua		0.8
Master Mix Roche 2X	1X	10
Primer cruzi1(10 μM)	0.75 μM	1.5
Primer cruzi2(10 μM)	0.75 μM	1.5
Primer IACFw 5 μM	0.1 μM	0.4
Primer IACRv 5 μM	0.1 μM	0.4
Sonda cruzi3 5 μM	0.05 μM	0.2
Sonda IAC 5 μM	0.05 μM	0.2
ADN		5
Volumen final		20

Tabla 7: Mezcla de reacción utilizada para la PCR en TR.

Objetivo específico 1:

ITEM I) Preparación de matriz

Se utilizaron epimastigotes de *T. cruzi del clon* CL Brener (perteneciente a la unidad discreta de tipificación Tc VI), provistos por el LABMECH, INGEBI. El cultivo de parásitos se realizó en 5 ml de medio LIT (Liver Infusion- Tryptose), utilizando botellas T25. Se partió de un cultivo saturado (10^8 parásitos/ml) y se traspasaron 50 microlitros de cultivo a 5 ml de medio. Se incubaron en estufa a 28°C repicándose semanalmente hasta la cosecha. Luego, se realizó el recuento de parásitos al microscopio óptico en cámara de Neubauer; a partir de dicho cultivo se realizaron diluciones seriadas en sangre seronegativa para Chagas anticoagulada con EDTA.

Las diluciones de trabajo fueron las siguientes:

10^5 eq.par/ml

10^3 eq.par/ml

10 eq.par/ml

1 eq.par/ml

0.1 eq.par/ml

0.01 eq.par/ml

0 eq.par/ml (control negativo)

Estas diluciones fueron extraídas con columnas comerciales (ver ITEM II) y colocado el ADN purificado en discos de papel de filtro, los cuales se secaron a temperatura ambiente por 3 horas y luego se guardaron en sobres de aluminio con desecante en la heladera hasta su procesamiento (24 hs a 3 meses). Los discos cargados fueron utilizados en el ITEM III

ITEM II) Protocolo de extracción de ADN de sangre directa

Se utilizaron columnas comerciales Roche “High Pure PCR Template Preparation Kit”. (Fabricado por Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania)

PROCEDIMIENTO

1. Encender termobloque a 70° C y colocar el Buffer de elución
2. Pipetear 200 µl de sangre entera, en un tubo de 1.5 ml

3. Colocar 5µl de IAC (control interno de amplificación) (40 pg/µl) a cada dilución, sólo en caso de realizar PCR en TR
4. Agregar 200 µl de *Binding* Buffer
5. Agregar 40 µl de proteinasa K reconstituida
6. Vortexear e incubar a 70° C por 10 min. Realizar minispin
7. Agregar 100 µl de isopropanol y vortexear; realizar minispin
8. Insertar una columna a un tubo colector y trasvasar la muestra. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
9. Remover el tubo colector y colocar uno nuevo
10. Agregar 500 µl de buffer removedor de inhibidores
11. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
12. Remover el tubo colector y colocar uno nuevo
13. Agregar 500 µl de Buffer de lavado
14. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
15. Remover el tubo colector y colocar uno nuevo
16. Agregar 500 µl de Buffer de lavado
17. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
18. Descartar el líquido del tubo colector y volverlo a colocar en la columna
19. Centrifugar a 14000 rpm por 10-15 seg
20. Insertar la columna en un tubo de 1.5 ml
21. Agregar 100 µl del Buffer de elución precalentado
22. Centrifugar 1 min a 8,000 x g

El tubo de microcentrífuga contiene el eluato, guardar el tubo en freezer de -70°C o -20°C, hasta su procesamiento.

ITEM III) Comparación de métodos de extracción de ADN de *T. cruzi* en matriz sanguínea absorbidos en papel de filtro

III.1 MÉTODO 1: Basado en un trabajo de Gómez y Uribe (Gómez y col, 2007)

Con un sacabocados de 3 mm de diámetro se tomaron porciones de los papeles de filtro preparados en el ITEM 1 y se colocaron directamente en los tubos de PCR junto con la mezcla de reacción. Para la dilución de 10⁵ eq.par/ml se tomaron 3, 6 y 12 porciones, para

el resto de las diluciones se tomaron 3 porciones. Se realizó la amplificación por PCR convencional de k-DNA con la totalidad de la muestra

III.2 MÉTODO 2:

A partir de cada papel de filtro preparado en el ITEM 1 se tomaron porciones con un sacabocado de 3 mm de diámetro y se realizó una elución en 100 µl de agua destilada estéril con agitación vigorosa; luego se realizó la amplificación por PCR convencional de k-DNA con 5 µl de cada elución en los tubos de reacción.

III.3 MÉTODO 3:

Se trabajó en base a un protocolo adaptado al papel de filtro según “Isolation of DNA from Dried Blood Spot using “High Pure PCR Template Preparation Kit” (Walter y col., 2009) con modificaciones para adaptarlo al propósito del trabajo.

A partir de cada papel de filtro preparado en el ITEM 1 se tomaron porciones de 3 mm de diámetro con un sacabocado y se colocaron en un tubo estéril con 300 µl de buffer de lisis de tejido, provisto en el kit de las columnas comerciales. (ver Materiales y Métodos, ITEM IV) y se realizó la amplificación por PCR de k-DNA con 5 µl de muestra.

III.3.1. Método de extracción de ADN de papel de filtro

1. Colocar el papel de filtro con la muestra en un tubo estéril de 1.5 ml con 40µl de proteinasa K y agregar 0.6 µl de IAC (40 pg/µl) a cada dilución (sólo para cuando se realice PCR en TR)
2. Agregar 300 µl de buffer de lisis de tejido, agitar, centrifugar e incubar 3 horas a 55°C
3. Agregar 300 µl de *binding* buffer, agitar, realizar minispin
4. Incubar a 70° C por 10 min. Realizar minispin
5. Agregar 100 µl de isopropanol agitar y realizar minispin
6. Insertar una columna a un tubo colector y trasvasar la muestra en 2 veces. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
7. Remover el tubo colector y colocar uno nuevo
8. Agregar 500 µl de buffer removedor de inhibidores

9. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
10. Remover el tubo colector y colocar uno nuevo
11. Agregar 500 µl de Buffer de lavado
12. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
13. Remover el tubo colector y colocar uno nuevo
14. Agregar 500 µl de Buffer de lavado
15. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
16. Descartar el líquido del tubo colector y volverlo a colocar en la columna
17. Centrifugar a 14000 rpm por 10-15seg
18. Insertar la columna en un tubo de 1.5 ml
19. Agregar 50µl del Buffer de elución precalentado
20. Centrifugar 1 min a 8,000 x g
21. El tubo de microcentrífuga contiene el eluato, guardar en freezer de -70°C o -20°C hasta su procesamiento

ITEM IV) Verificación de la presencia de inhibidores: se realizaron amplificaciones por PCRc k- DNA colocando en los tubos de reacción un disco de 3 mm de diámetro de papel de filtro S&S 903 como se detalla a continuación:

Tubo 1: Mezcla de reacción + papel de filtro vacío

Tubo 2: Mezcla de reacción + papel de filtro vacío + 5 µl de control positivo de ADN *T. cruzi* (1pg/µl)

Tubo 3: Control negativo (agua)

Tubo 4: Mezcla de reacción + papel de filtro impregnado con sangre contaminada con una dilución de 10^6 eq par/ml.

Tubo 5: Mezcla de reacción + papel de filtro impregnado con sangre contaminada con una dilución de 10^6 eq.par/ml + 5 µl de control positivo de *T. cruzi* (1pg/µl)

Tubo 6: Control negativo (agua)

Tubo 7: Control negativo (agua)

Tubo 8: Control positivo de ADN *T. cruzi* (1pg/µl): 5 µl

Objetivo específico 2:

ITEM V) Determinación de sensibilidad analítica

V) A) Curvas de sensibilidad de parásitos: Se realizaron tres cultivos de parásitos (clon CL Brener) en días diferentes como se indica en el ITEM 1; luego de la cosecha, se procedió a realizar los recuentos en cámara de Neubauer y finalmente se construyeron 3 curvas de sensibilidad independientes; para ello, se realizaron diluciones seriadas en sangre entera anticoagulada con EDTA con serología negativa para Chagas hasta obtener las siguientes concentraciones:

1000 eq.par/ml

100 eq.par/ml

20 eq.par/ml

10 eq.par/ml

5 eq.par/ml

1 eq.par/ml

0.5 eq. par/ml

0 eq. par/ml (control negativo)

De cada punto de las curvas se colocaron 3 gotas (25 μ l cada una) de sangre contaminada en cada círculo de papel de filtro

V) B) Curvas de sensibilidad de ADN: la cuantificación del ADN fue determinada por espectrofotometría (NanoDrop 100) calculada a través de la absorbancia a 260 nm (A260) y la pureza se obtuvo mediante la relación A260/A280 aceptándose como puro una proporción de 1.8 (Sambrook y col., 1989). Luego se realizaron diluciones seriadas del ADN utilizando como matriz sangre entera anticoagulada con EDTA con serología negativa para Chagas hasta obtener las siguientes concentraciones:

1000 fg/ μ l

100 fg/ μ l

10 fg/ μ l

1 fg/ μ l

0.1fg/ μ l

0 fg/ μ l

De cada punto de la curva se colocó 1 gota de sangre contaminada en cada círculo de papel de filtro

Procedimiento:

1. Se realizó la extracción de ADN de sangre directa de las diluciones realizadas en los puntos IA y IB con columnas (ver ITEM II) y se guardó el eluato en freezer de -20°C
2. Los papeles de filtro cargados se dejaron secar a temperatura ambiente por 3 horas y se guardaron en un sobre de aluminio con desecante en heladera hasta su procesamiento (24 hs a 3 meses).
3. Se realizó la extracción de ADN para cada dilución tanto de parásitos como de ADN colocadas en papel de filtro (ver ITEM III.3.1) pero en este caso no se utilizó sacabocados sino que se recortó directamente toda la mancha de sangre seca con tijera, limpiando con lavandina diluída y secando la misma entre muestra y muestra.
4. Se realizaron las PCRc para todos los eluatos para los blancos moleculares k-DNA (iniciadores 121/122) y sat-DNA (iniciadores TC1/TC2).
5. Se realizó la PCR en TR para una de las series de diluciones

Se realizaron las siguientes curvas de sensibilidad:

1. Curva de sensibilidad analítica de eq. par/ml para sangre directa: de cada una de las tres curvas se hicieron tres extracciones (una extracción de cada gota) y luego una amplificación de PCRc (k- DNA y sat-DNA) de cada eluato, la PCR en TR se realizó a partir de una sola curva, por duplicado.
2. Curva de sensibilidad analítica de eq. par/ml para sangre en papel de filtro: ídem punto 1.
3. Curva de sensibilidad analítica de ADN para sangre directa. Se hizo una extracción y luego las amplificaciones por PCRc y PCR en TR se hicieron por duplicado
4. Curva de sensibilidad analítica de ADN para sangre en papel de filtro: ídem 3

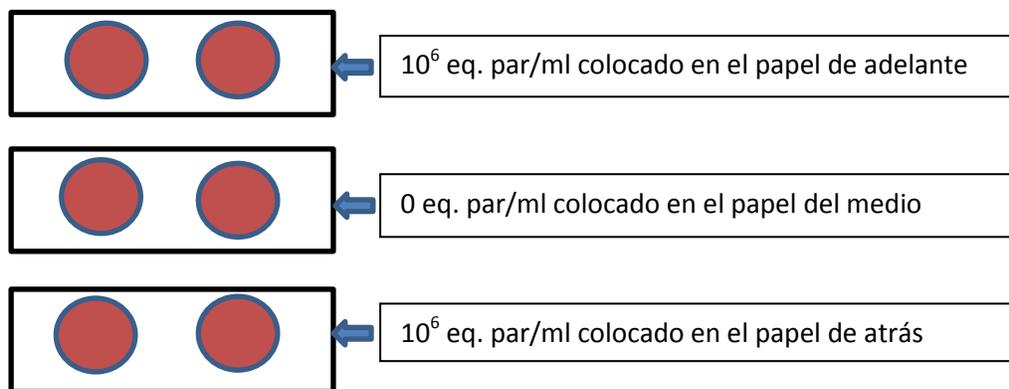
V) C) Límite de detección (LoD): El LoD se calculó como la carga parasitaria más baja que proporciona $\geq 95\%$ de los resultados detectables por PCRc para los blancos k-DNA y sat-DNA de sangre directa y sangre en papel de filtro, de acuerdo con las normas del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (NCCLSI, 2004) adaptadas a los propósitos de este trabajo. Se determinó a partir de tres paneles de sangre con EDTA contaminadas con distintas concentraciones de *T. cruzi*. (según V)A). Para los tres paneles se realizaron tres repeticiones de cada una: 9 réplicas en total. El LoD se calculó por análisis de regresión Probit con Minitab 15 Statistical Software (Minitab Inc., State College, PA).

ITEM VI) Estudio de especificidad analítica

Se estudiaron 5 matrices sanguíneas negativas para *T. cruzi* colocadas en papel de filtro y, se realizaron las respectivas extracciones de ADN (ver ITEM III.3.1); luego se realizaron las ampliaciones por PCRc: sat-DNA y k-DNA.

ITEM VII) Estudio de contaminación entre papeles de filtro contiguos

Metodología: se colocó un papel de filtro impregnado con 2 gotas de sangre contaminada con 10^6 eq.par/ml, en el medio un papel de filtro con 2 gotas de sangre seronegativa para Chagas y por debajo otro papel impregnado con 2 gotas de sangre contaminada con 10^6 eq.par/ml. Una vez secas las muestras sembradas, los 3 papeles de filtro se conservaron en estrecho contacto por 2 semanas en heladera y luego se realizaron las respectivas extracciones (ver ITEM VI) y PCRc sat-DNA, k-DNA por duplicado



Esquema 1: Estudio de contaminación entre papeles de filtro contiguos

Objetivo específico 3:

ITEM VIII) Muestras clínicas estudiadas durante el desarrollo de la tesis

Se estudiaron por métodos moleculares un total de 86 muestras clínicas procedentes de distintos grupos de pacientes seguidos en los siguientes centros de salud:

- Hospital Prof. A. Posadas, Buenos Aires: 42 muestras correspondientes a 40 pacientes
- INGEBI (Instituto de Genética y Biología Molecular), Ciudad Autónoma de Buenos Aires: 32 muestras correspondientes a 22 pacientes
- Hospital Sant Pau, Barcelona: 12 muestras correspondientes a 12 pacientes

En los casos de pacientes con más de una muestra analizada las mismas correspondían a distintas venopunciones realizadas en diferentes momentos de la vida del paciente.

Las muestras clínicas se dividieron en 3 grupos:

Grupo a) Recién nacidos, hijos de madres con serología positiva para Chagas con edades comprendidas entre 0 y 10 meses: 38 muestras de sangre periférica (utilizadas en el ITEM IX) y 4 tarjetas de pesquisa neonatal (utilizadas en el ITEM XI) (n = 42).

Grupo b) Adultos infectados inmunosuprimidos con sospecha o riesgo de reactivación chagásica: 34 muestras (n = 34), pertenecientes a pacientes con los siguientes diagnósticos:

- Pacientes VIH(+) con sospecha de Chagoma cerebral, 4 muestras de sangre y 2 muestras de LCR
- Pacientes transplantados: 26 muestras de sangre periférica:
- ✓ Pacientes con Chagas crónico receptores de transplante (receptor positivo/dador negativo) con riesgo de reactivación por tratamiento inmunosupresor:
 - 5 Muestras de pacientes con transplante de médula ósea
 - 4 Muestras de pacientes con transplante cardíaco
 - 12 Muestras de pacientes con transplante hepático
 - 1 Muestra de un paciente con transplante renal
 - 3 Muestras de pacientes con transplante no especificado
- ✓ Receptores no infectados, de órganos provenientes de pacientes infectados con *T.cruzi* con riesgo de infección aguda transmitida por el transplante.
 - 1 Muestra de un paciente con transplante hepático
- Otras situaciones de inmunocompromiso:
 - 2 Muestras de un pacientes con artritis reumatoidea en tratamiento inmunosupresor

Grupo c) Muestras de pacientes adultos con serología negativa para Chagas (2 técnicas serológicas, n=10)

Los pacientes del grupo a) y b) presentaban orden médica solicitando el estudio de PCR para *Trypanosoma cruzi*.y los pacientes de grupo c) presentaban solicitud de serología para Chagas

ITEM IX) Evaluación de SC, E, VPP y VPN respecto a la PCR en sangre directa como método de referencia.

Se analizaron las muestras de los pacientes en forma directa con PCRc (sat-DNA y k-DNA) y PCR en TR (sat-DNA) por duplicado; a su vez se colocó una gota de cada muestra de

sangre en el papel de filtro y luego de la extracción se realizaron las amplificaciones descriptas.

Se trabajó con el programa estadístico InfoStat/L.

IX)1) Procesamiento de las muestras: Se tomaron 200 μ l de sangre de pacientes, se extrajo el ADN con columnas (ver ítem II): es lo que llamamos “sangre directa” y se guardó el eluato (100 μ l) en freezer de -20°C ; simultáneamente se colocó una gota (25 μ l) de cada muestra en cada círculo del papel de filtro (Schleicher & Schuell 903), se realizó la extracción de ADN, cortando cada gota seca de la muestra de sangre con tijera y se procedió a la extracción del ADN (ver ÍTEM III.3.1): es lo que llamamos “sangre en papel de filtro”.

De todos los eluatos obtenidos luego de las extracciones de sangre directa y de sangre en papel de filtro se realizó la PCR en TR multiplex y las PCRc dirigidas al k-DNA, a sat-DNA y al gen control β actina humana. Se determinó la SC, E, VPP y VPN de los resultados obtenidos en papel de filtro utilizando como referencia los resultados obtenidos con la misma técnica de amplificación pero con sangre directa.

ÍTEM X) Evaluación de Sensibilidad clínica respecto al diagnóstico convencional como estándar de oro para la detección molecular de Chagas congénito.

Para el análisis de sensibilidad clínica se compararon los resultados obtenidos en muestras de 13 bebés con diagnóstico convencional de Chagas congénito (Micrométodo positivo y/o serología positiva a partir de los 10 meses) analizadas en forma directa y en papel de filtro mediante PCRc (sat-DNA y k-DNA) y PCR en TR (sat-DNA) por duplicado.

ÍTEM XI) Estudio de especificidad clínica con respecto al diagnóstico serológico como estándar de oro.

Se seleccionaron 17 muestras de pacientes con serología negativa para Chagas, (7 del grupo a, y 10 del grupo c, ÍTEM VIII) para evaluar la especificidad clínica comparativa de los métodos de PCR c sat-DNA y k-DNA y PCR en TR en sangre directa y sangre impregnada en papel de filtro.

Se descartaron falsos negativos mediante PCRc para gen de β actina humana.

ITEM XII) Criterios de interpretación de resultados:

La PCRc se considera *positiva* cuando las dos PCR de *T. cruzi* (k-DNA y sat-DNA) y el gen control de β actina humana son positivas y se considera *negativa* cuando las dos PCR para *T. cruzi* son negativas y el gen control de β actina humana positivo. Se considera *inválida* cuando la β Actina humana es negativa y se considera *discordante* si las PCR de *T. cruzi* (k-DNA y sat-DNA) presentan resultados diferentes.

La PCR en TR se considera *positiva* con un Ct para *T. cruzi* menor a 40 y el Ct del IAC cercano a 20 y se considera *negativa* con un Ct para *T. cruzi* mayor a 40 y el Ct del IAC cercano a 20 (Duffy y col, 2013). Se considera *inválida* cuando el IAC presenta un valor atípico (outlier) definido según el criterio de Tukey (Burns y col., 2005)

ITEM XIII) Estudio de concordancia

Se evaluó la concordancia entre los resultados de las determinaciones obtenidas por las distintas técnicas de amplificación a través de la aplicación del índice de concordancia para 3 observadores con 2 categorías para el total de muestras (grupo a y grupo b, directos y papel de filtro) con un intervalo de confianza del 95% (IC95). Programa Epidat 3.1

Se utilizó la escala propuesta por Landis y Koch (Landis y Koch, 1977) para la interpretación de los resultados

Kappa	Grado de acuerdo
<0	No acuerdo
0.0-0.2	Insignificante
0.2-0.4	Bajo
0.4-0.6	Moderado
0.6-0.8	Bueno
0.8-1.0	Muy Bueno

Tabla 8: Valoración del coeficiente Kappa

ITEM XV) Estudio sobre muestras de pesquisa neonatal

Se solicitaron al sector “Pesquisa Neonatal” cuatro tarjetas originales de bebés con diagnóstico confirmado de Chagas congénito por microscopía (técnica de Buffy Coat) y por PCR en sangre directa. Las muestras habían sido tomadas de los talones de los recién nacidos durante sus primeros días de vida, según normas de procedimiento establecidas (ver ANEXO) Una vez finalizados los estudios metabólicos correspondientes, las tarjetas se guardaron en un freezer de -20 °C hasta que se remitieron para su procesamiento en el contexto de la tesis. Con las tarjetas de estos pacientes se realizó la extracción de ADN (ver ITEM VI), las amplificaciones de sat-DNA y k-DNA por PCRc y se enviaron las muestras para la cuantificación de parásitos por PCR en TR al INGEBI.

RESULTADOS

Objetivo específico 1) Se evaluó la sensibilidad analítica de la PCRc para k-DNA en muestras de papel de filtro conteniendo ADN de *T. cruzi* en matriz sanguínea utilizando diferentes métodos de extracción

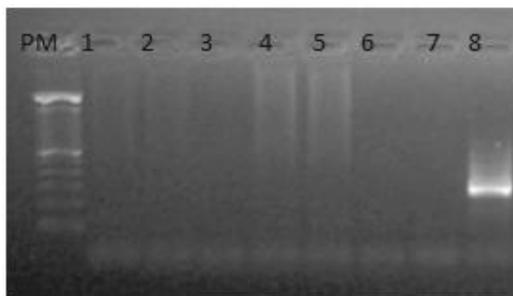
Objetivo específico 2) Se comparó el desempeño de tres métodos de amplificación (PCRc k-DNA, PCRc sat-DNA y PCR en TR) aplicados a muestras de sangre contaminada con parásitos de cultivo extraídas con la metodología elegida en el objetivo específico 1, antes (sangre directa) y después de ser colocadas en papel de filtro.

Objetivo específico 3) Se aplicó el estudio molecular de *T. cruzi* a muestras de pacientes utilizando la metodología de extracción seleccionada según el objetivo específico 1 y las metodologías de amplificación evaluadas según el objetivo específico 2 .

Objetivo Específico 1:

En primera instancia se realizó una amplificación por PCRc de k-DNA colocando en la mezcla de reacción porciones de 3 mm de diámetro de papel de filtro impregnado con distintas diluciones de ADN de *T. cruzi* en matriz sanguínea (Materiales y Métodos, ITEM III, método 1). No se observaron bandas de amplificación para ninguna de las diluciones ensayadas, sugiriendo la presencia de sustancias inhibitorias en el papel de filtro y/o en el extracto de la matriz. Para verificar esta hipótesis se diseñó un experimento con el fin de detectar presencia de inhibidores (Materiales y Métodos, ITEM IV). Para esto, se colocaron discos de papel de filtro en la mezcla de reacción más un control positivo de ADN de *T. cruzi* (Figura 11) En ningún caso se observó banda de amplificación compatible con ADN de *T. cruzi* (k- DNA) indicando la presencia de inhibidores en el papel de filtro (Figura 11 calle 2)

Figura 11: Verificación de la presencia de inhibidores en el papel de filtro



Calles: PM: Marcador de peso molecular, 1: papel de filtro vacío, 2: papel de filtro vacío + control positivo de *T. cruzi* (1pg/ μ l), 3, 6 y 7: Controles negativo (agua), 4: papel de filtro impregnado una dilución de 10^6 eq.par/ml de sangre, 5: papel de filtro impregnado una dilución de 10^6 eq.par/ml de sangre, + control positivo de *T. cruzi* (1pg/ μ l), 8 control positivo de *T. cruzi* (1pg/ μ l)

En todos los casos el papel de filtro inhibió la PCR, lo que nos llevó a ensayar métodos que permitan eluir el ADN del papel de filtro.

A partir del ADN extraído (obtenido de una curva de parásitos en sangre. Materiales y métodos, ITEM I) y colocado en los papeles de filtro se realizaron 2 metodologías de elución del ADN para luego realizar una amplificación por PCRc de k-DNA

*Elución en agua estéril (Materiales y Métodos, ITEM III, método 2): Se observaron bandas de amplificación compatibles con ADN de *T. cruzi* obtenido a partir de diluciones

10^5 y 10^3 eq.par/ml. Este resultado se interpretó como una eliminación incompleta de inhibidores ya que solo se pudieron detectar las concentraciones más altas.

*Extracción mediante columnas comerciales previa incubación con buffer de lisis de tejido, modificado de Walter y col, 2009 (Materiales y Métodos, ITEM III, 3.1): Se colocaron en un tubo estéril los discos de papel de filtro para cada dilución con 300 µl de buffer de lisis de tejido, provisto en el kit de las columnas comerciales. Se incubaron 3 horas a 55°C junto con proteinasa K y luego se continuó según el protocolo de extracción de las columnas; al finalizar, el ADN se recogió en 50 µl de buffer de elución (ver Materiales y Métodos, ITEM III.3.1). Se realizó la amplificación por PCRc de k-DNA con 5 µl de cada elución en los tubos de reacción. En este caso se observaron bandas de amplificación compatibles con ADN de *T. cruzi* obtenido a partir de diluciones 10^5 , 10^3 y 10 eq.par/ml, lo que sugirió que esta metodología logró una eliminación más efectiva de los inhibidores respecto al método anterior con una sensibilidad analítica de al menos 10 eq.par/ml

En base a los resultados obtenidos (tabla 9), se eligió esta última metodología para trabajar en los objetivos específicos siguientes.

Tabla 9: Resultado de las amplificaciones de k-DNA con los distintos métodos de extracción

Concentración de partida (eq.par/ml)	Cantidad de porciones	PCR k-DNA		
		Método1	Método2	Método3
10^5	3	-	+	+
10^5	6	-	NRZ	NRZ
10^5	12	-	NRZ	NRZ
10^3	3	-	+	+
10	3	-	-	+
1	3	-	-	-
0.1	3	-	-	-
0.01	3	-	-	-
0	3	-	-	-

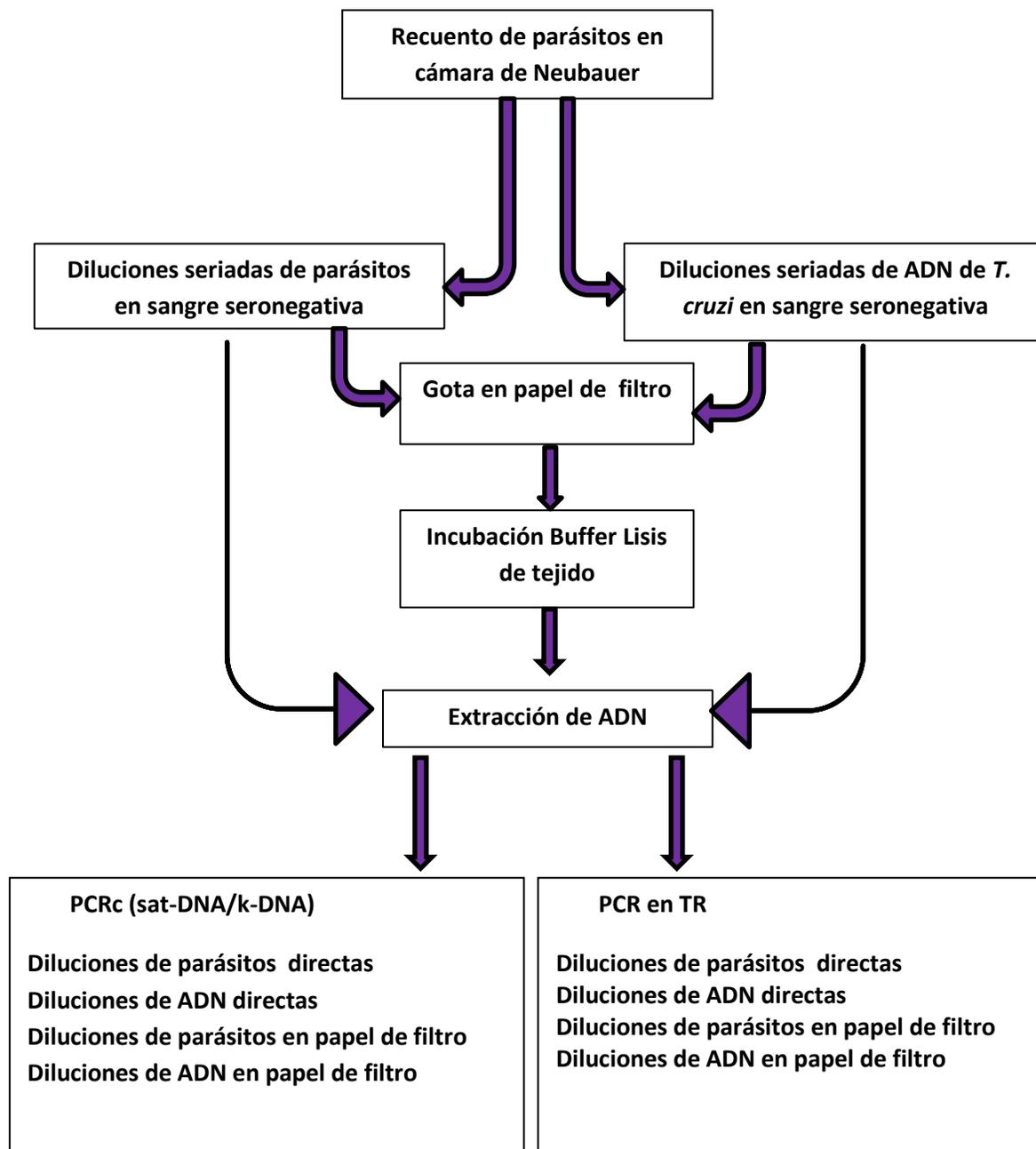
NRZ: no realizado.

Objetivo específico 2: El propósito de esta etapa del trabajo de tesis fue evaluar el desempeño de ensayos de PCRc y de PCR en TR para la detección molecular de ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre seca contaminada, impregnada en papel de filtro.

Para esto se procedió en 3 fases:

- 1) Se realizaron curvas de sensibilidad analítica, determinadas en: A) equivalentes parasitarios /ml (eq. par/ml) y B) masa de ADN de *T. cruzi*/ μl (fg/ μl) en ambos sistemas de PCR en forma comparativa: en sangre directa y en sangre inmovilizada en papel de filtro
- 2) Se estudió especificidad analítica evaluando la ausencia de amplificación por PCRc trabajando con matrices de sangre humana negativas para *T. cruzi* inmovilizadas en papel de filtro.
- 3) Se realizó una evaluación de contaminación entre papeles de filtro contiguos en contacto directo por PCRc

FASE 1) Ensayos de sensibilidad analítica (Materiales y métodos, ITEM V)



Esquema 2: Flujograma de trabajo para las curvas de sensibilidad analítica

Los resultados de las amplificaciones se muestran en las siguientes tablas:

Tabla 10: Curva de eq. par /ml para sangre directa y sangre colocada en papel de filtro para las dianas sat-DNA y k-DNA amplificadas por PCRc

Diluciones (eq.par/ml)	Réplicas	SANGRE DIRECTA				PAPEL DE FILTRO			
		Sat-DNA		k- DNA		Sat-DNA		k- DNA	
		Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg
0	9	0	9	0	9	0	9	0	9
0.5	9	4	5	6	3	1	8	0	9
1	9	6	3	8	1	2	7	4	5
5	9	9	0	9	0	6	3	8	1
10	9	9	0	9	0	8	1	8	1
20	9	9	0	9	0	9	0	9	0
100	9	9	0	9	0	9	0	9	0
1000	9	9	0	9	0	9	0	9	0

Pos: Número de ensayos que detectaron ADN de *T. cruzi*; Neg: Número de ensayos que no detectaron ADN de *T. cruzi*

Se determinó el LoD (Materiales y Métodos V) C) mediante un análisis Probit para PCRc: en sangre directa por PCR sat-DNA resultó 1.45 eq. par/ml (CI95% 1,06-3,54), por PCR k-DNA fue de 1.00 eq. par/ml (CI95% 0,76-1,77). Para sangre en papel de filtro por PCR sat-DNA el LoD fue de 10.33 eq. par /ml (CI95% 7,69-17,11) y por PCR k-DNA de 8.97eq. par/ml (CI95% 6,59-15,04). Para PCR en TR no se determinó LoD; sólo se realizó una curva por duplicado resultando la sensibilidad analítica para sangre directa de 0.5 eq. par/ml y para papel de filtro de 1 eq. par/ml.

Tabla 11: Curva de eq. par /ml para sangre directa y sangre colocada en papel de filtro amplificado por PCR en TR multiplex por duplicado

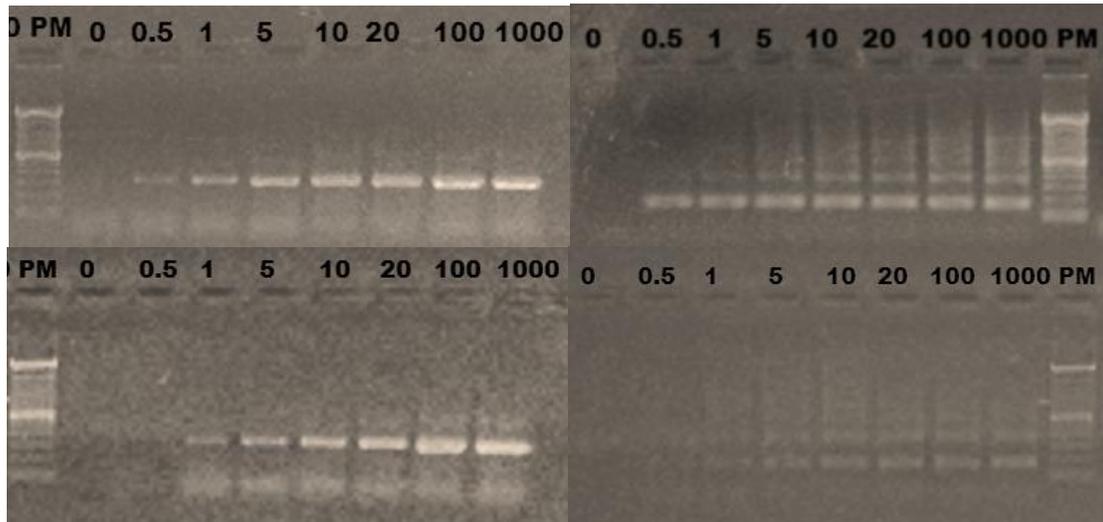
Diluciones (eq. par/ml)	SANGRE DIRECTA	PAPEL DE FILTRO
0	-/-	-/-
0.5	+/+	-/-
1	+/+	+/+
5	+/+	+/+
10	+/+	+/+
20	+/+	+/+
100	+/+	+/+
1000	+/+	+/+

Tabla 12: Curva de masa de ADN de *T. cruzi* para sangre directa y sangre colocada en papel de filtro por duplicado

Diluciones (fg/ μ l)	SANGRE DIRECTA			PAPEL DE FILTRO		
	Sat-DNA	k- DNA	PCR en TR	Sat-DNA	k- DNA	PCR en TR
0	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
0.1	+/-	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-
1	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
10	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
100	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
1000	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

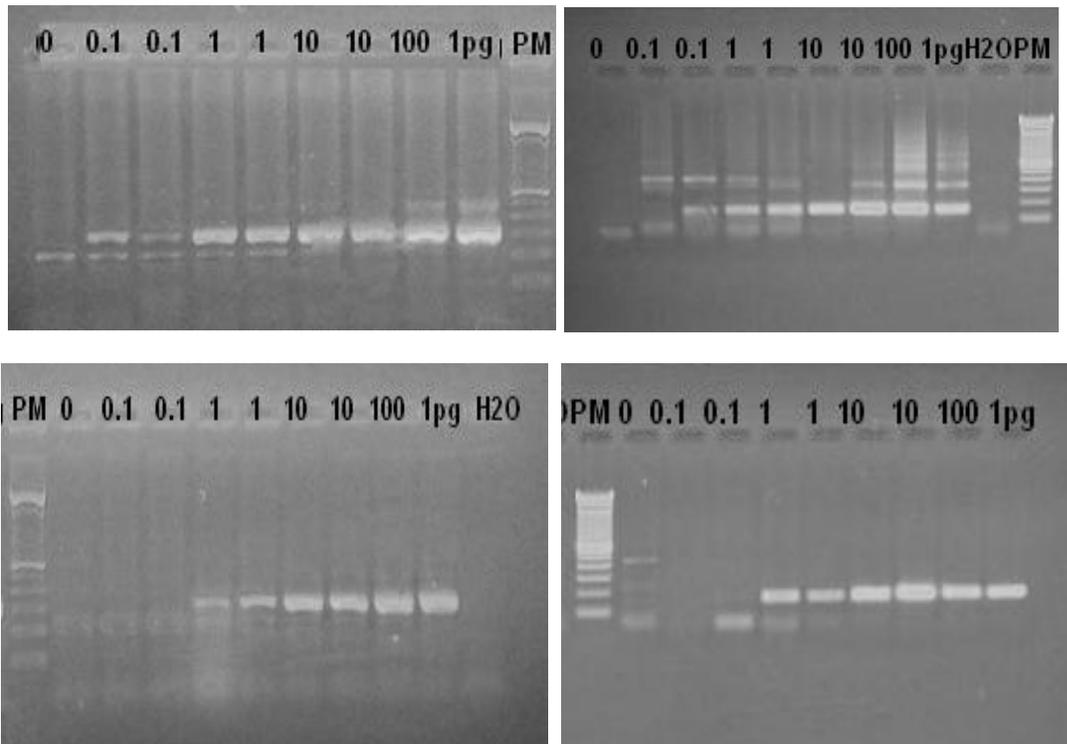
Las siguientes figuras corresponden a las corridas electroforéticas mostrando los resultados de PCRc para k-DNA y sat-DNA. Se observa una banda predominante a la altura de 330 pb para las corridas realizadas con los cebadores de k-DNA y una banda predominante a la altura de 188 pb, correspondientes a una unidad de repetición del ADN satélite. Las bandas de peso molecular superior son multímeros de la unidad de ADN satélite.

Figura 12: Curvas de eq. par/ml



Arriba: Eq. par/ml en sangre directa. Abajo: eq. par/ml en papel de filtro. Izquierda: k-DNA derecha: sat-DNA. Marcador de peso molecular de 100 pb,

Figura 13: Curvas de masa de ADN de *T. cruzi*



Arriba: ADN de *T. cruzi* (fg/ μ l) en sangre directa. Abajo: ADN de *T. cruzi* (fg/ μ l) en papel de filtro. Izquierda: k-DNA, derecha: sat-DNA. Marcador de peso molecular de 100 pb,

Las siguientes figuras corresponden a las curvas obtenidas en las amplificaciones por PCR en TR en TR

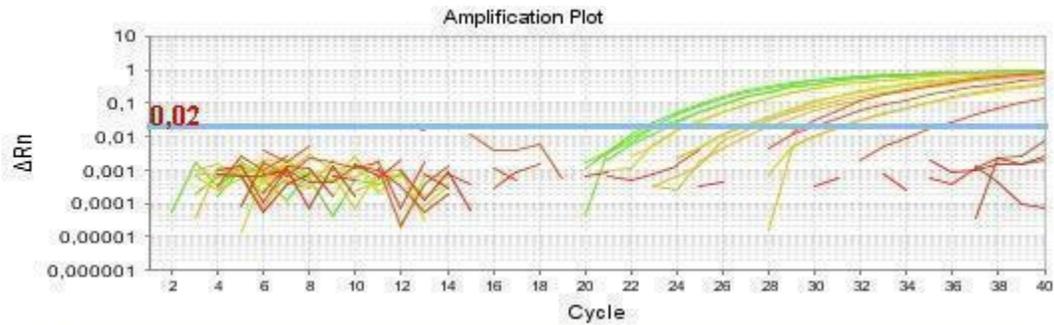


Figura 14: fluorescencia medida versus número de ciclo para la detección de *T. cruzi* por PCR en TR de diluciones de eq. par /ml en papel de filtro

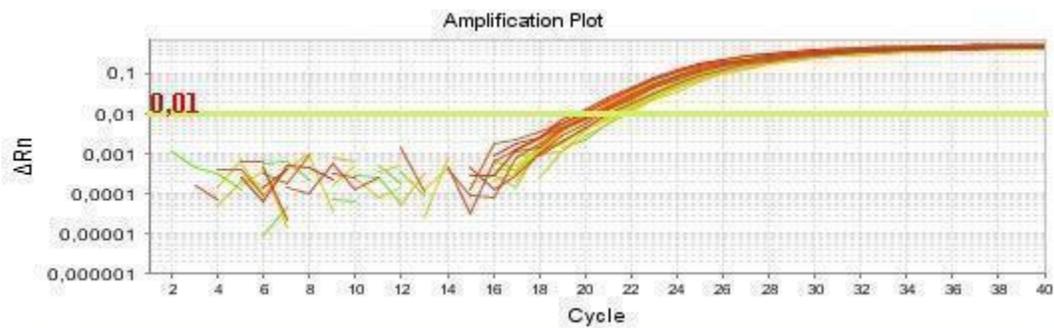


Figura 15: fluorescencia medida versus número de ciclo para la detección de IAC por PCR en TR de diluciones de eq. par /ml en papel de filtro.

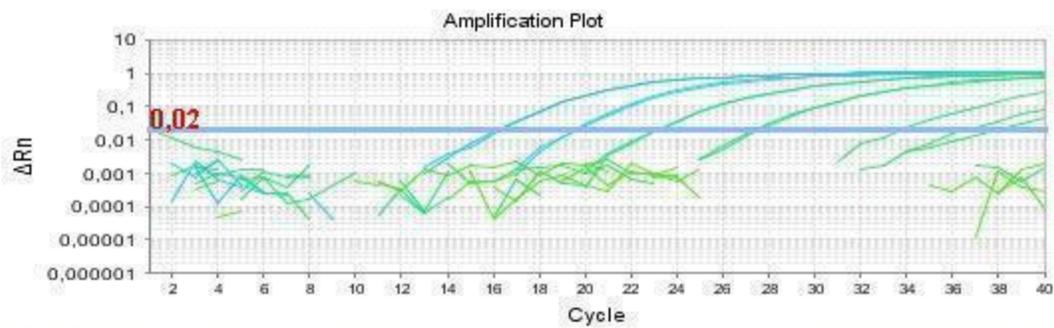


Figura 16: fluorescencia medida versus número de ciclo para la detección de *T. cruzi* por PCR en TR de diluciones de ADN de *T. cruzi* (fg/ μ l) en papel de filtro

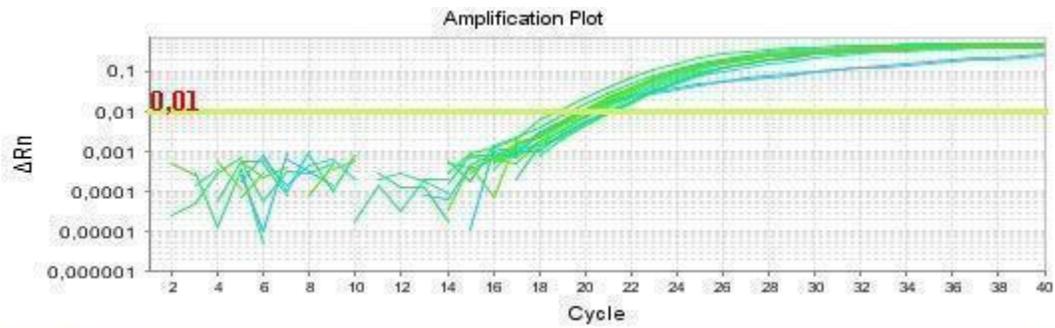


Figura 17: fluorescencia medida versus número de ciclo para la detección de IAC por PCR en TR de diluciones de ADN de *T. cruzi* (fg/μl) en papel de filtro

Las muestras fijadas al papel de filtro no presentaron falsos negativos por inhibición de la PCR, ni falsos positivos en las muestras no picadas con parásito o ADN de *T. cruzi*. En todos los casos se obtuvo un valor de Ct para el IAC de alrededor de 20, lo cual permite validar las lecturas obtenidas para la PCR en TR (figuras 15 y 17).

Los LoD obtenidos con 9 réplicas en las amplificaciones por PCRc dan un valor cercano a 1 eq. par/ml para las diluciones en sangre directa y a 10 eq. par/ml para las diluciones realizadas a partir de la sangre colocada en el papel de filtro y luego extraídas. En el caso de la PCR en TR sólo se realizó una amplificación por duplicado arrojando un valor de 0.5 eq. par/ml para sangre directa y 1 eq. par/ml para las diluciones de sangre en papel de filtro. En la figura 13 se observa la sensibilidad analítica expresada en masa de ADN; para los 3 sistemas de amplificación estudiados los resultados coincidieron: 0.1 fg/μl para las diluciones realizadas en sangre directa y 1 fg/μl para las diluciones de ADN en sangre colocadas en el papel de filtro y luego extraídas. Si consideramos que un parásito contiene aproximadamente 200 fg de ADN, la sensibilidad analítica determinada en masa de ADN sería equivalente a 0.5 eq. par/ml en sangre directa y a 5 eq. par/ml en sangre seca en papel de filtro.

Los resultados obtenidos en ambos tipos de ensayo (eq. par/ml o ADN de *T. cruzi*) verifican una diferencia de alrededor de un orden inferior entre la capacidad de detección de *T. cruzi* en sangre colocada en papel de filtro y en sangre directa para todas las amplificaciones estudiadas.

FASE 2: Estudio de especificidad analítica (ver Materiales y métodos, ITEM VI)

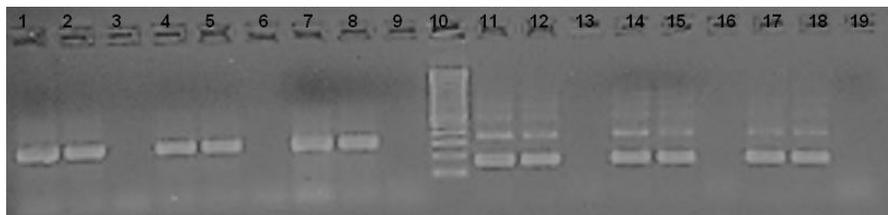
Las 5 matrices estudiadas negativas para *T. cruzi* colocadas en el papel de filtro, luego extraídas y amplificadas por PCRc resultaron negativas para ambos juegos de cebadores indicando la especificidad del ensayo (datos no mostrados)

FASE 3: Estudio de contaminación entre papeles de filtro contiguos: (ver Materiales y métodos, ITEM VII)

En el estudio de pesquisa neonatal muchas veces los papeles de filtro que contienen las muestras de los recién nacidos se guardan todos juntos sin separaciones de por medio, lo cual podría dar lugar a contaminaciones entre muestras teniendo en cuenta la elevada parasitemia detectada en neonatos con Chagas congénito y la alta sensibilidad de los métodos de amplificación génica. Por este motivo, se quiso estudiar la ocurrencia de falsos positivos de muestras negativas impregnadas en papel de filtro poniéndolas en contacto estrecho con muestras positivas que contienen altas cargas de parásitos colocadas en papeles de filtro contiguos, por encima o por debajo de las superficies en contacto.

En los papeles de filtro impregnados con sangre seronegativa para infección por *T. cruzi* sin contaminar con parásitos se obtuvo amplificación con ambos juegos de primers para *T. cruzi*, demostrando el riesgo de contaminación que podría correrse en el procesamiento de muestras clínicas, al no proteger muestras contiguas (Figura 28).

Figura 28: PCRc de papel de filtro utilizado en el estudio de contaminación,

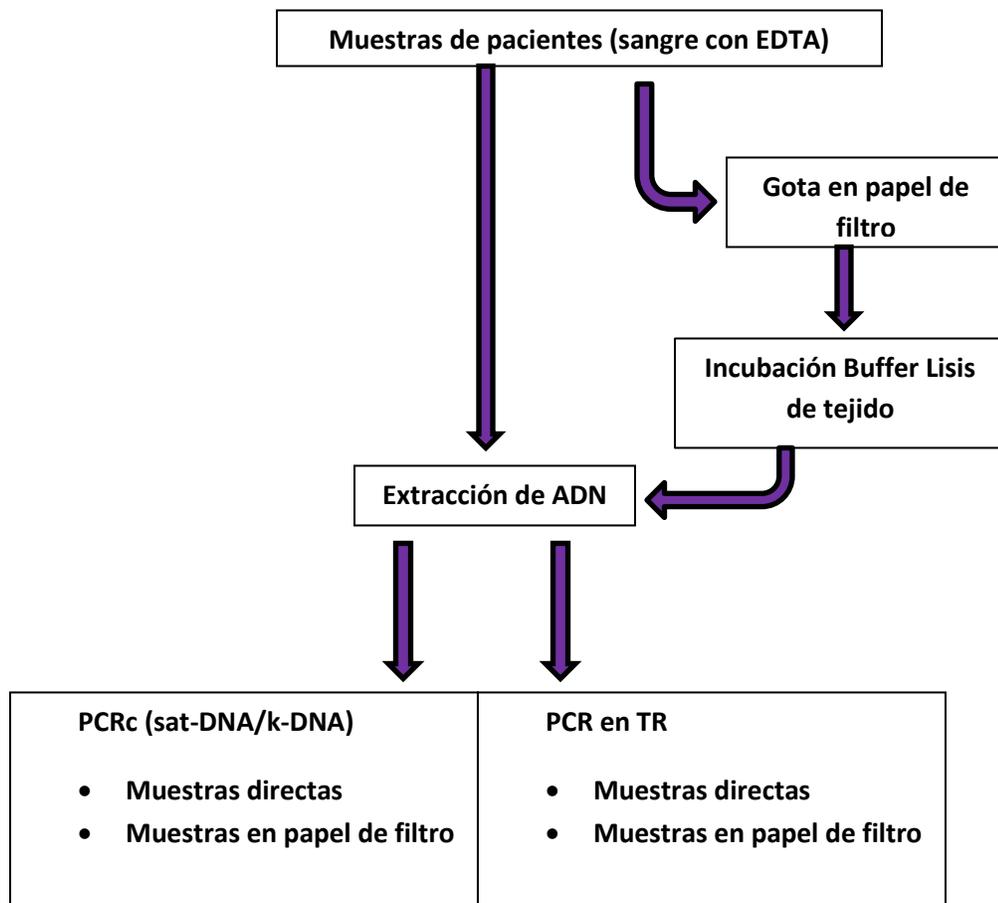


Izquierda k- DNA, derecha sat-DNA: Calles 1, 2, 11 y 12 papel de filtro contaminado con 10^6 eq. par/ml, calles 4, 5, 14 y 15 papel de filtro con sangre seronegativa para Chagas, calles 7, 8, 17 y 18 papel impregnado con sangre contaminada con 10^6 eq. par/ml, calle 3, 6, 9, 13, 16 y 19 agua, calle 10 marcador de peso molecular de 100 pb.

Objetivo específico 3: En esta etapa se procedió en cuatro fases:

- 1) Evaluación de sensibilidad clínica (SC), especificidad (E), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de los ensayos en papel de filtro, tomando como referencia las mismas muestras evaluadas en sangre directa
- 2) Evaluación de sensibilidad y especificidad clínicas de las muestras ensayadas en papel de filtro y en sangre directa tomando como referencia el diagnóstico convencional
- 3) Estudio de concordancia entre las técnicas
- 4) Estudio sobre tarjetas originales del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal

FASE 1: En esta etapa se trabajó con muestras clínicas provenientes de distintos centros pertenecientes a pacientes con diferentes diagnósticos (ver Materiales y métodos, ITEM VIII)



Esquema 3: flujograma de trabajo para el estudio comparativo de muestras clínicas en paralelo (sangre directa – papel de filtro)

1) Evaluación de SC, E, VPP y VPN: (ver Materiales y métodos, ITEM IX)

Evaluación en el grupo a) Recién nacidos, hijos de madres con serología positiva para Chagas: 38 muestras de sangre periférica (n = 38) pertenecientes a 38 bebés.

En este grupo de pacientes analizados se estudiaron 38 muestras de sangre en paralelo (SD-papel de filtro). De los 38 recién nacidos analizados, 5 fueron diagnosticados como congénitos por Micrométodo y a 15 se les realizaron los métodos serológicos confirmatorios a los 10 meses de edad. Del resto los datos no están disponibles y se encuentran en seguimiento. Si bien la metodología de referencia para confirmar o descartar el diagnóstico definitivo es la observación microscópica del *T. cruzi* o la serología a partir de los 10 meses de edad, para los fines de esta tesis se tomó como referencia en esta fase la PCR en SD de cada muestra analizada.

Para la metodología PCR en TR se obtuvo una SC menor (78.9%) a las obtenidas por metodologías de PCRC (94% para k- DNA y 88% para sat-DNA), porque se consideraron positivas en SD 2 muestras cuyos duplicados fueron discordantes (RN24 y RN30), una de las cuales se pudo confirmar por serología y en la otra no se pudo constatar el status serológico. Con el fin de situar la evaluación del papel de filtro en la posición más exigente las muestras discordantes mencionadas se tomaron como positivas, aunque no hubiera correspondido con fines de diagnóstico.

a)1) PCR en TR de sangre directa versus PCR en TR de sangre impregnada en papel de filtro: El porcentaje de positividad obtenido en este grupo fue de 50% para las muestras directas y de 39.5 % para las muestras en papel de filtro.

2 muestras dieron positiva la PCR en TR en sangre directa y negativa la PCR en TR en papel de filtro (5RN y 28RN).

2 muestras que presentaron discordancia entre los duplicados (uno positivo y uno negativo) por PCR en TR en sangre directa: la muestra RN 24 y la muestra RN 30, se consideraron positivos para el cálculo de SC.

SC: 78.9%, E: 100%, VPP: 1, VPN: 0.83

Directos de sangre				
Papel de		-	+	Total
filtro	-	19	4	23
	+	0	15	15
	total	19	19	38

Tabla 13: comparación de resultados de sangre directa versus sangre en papel de filtro en recién nacidos por PCR en TR

a)2) kDNA sangre directa versus kDNA sangre en papel de filtro: hubo una muestra que dio positiva la PCR en sangre directa y negativa en papel de filtro (5RN). SC: 94%, E: 100%, valor VPP: 1, VPN: 0.95

Directos de sangre				
Papel de		-	+	Total
filtro	-	21	1	22
	+	0	16	16
	total	21	17	38

Tabla 14: comparación de resultados de sangre directa versus sangre en papel de filtro en recién nacidos por PCRc (k-DNA)

a)3) sat-DNA sangre directa versus sat-DNA sangre en papel de filtro: hubo 2 muestras que dieron positiva la PCR en sangre directa y negativa la PCR en papel de filtro (5RN y 18RN). SC: 88%, E: 100%, VPP: 1, VPN: 0.91

Directos de sangre				
Papel de		-	+	total
filtro	-	21	2	23
	+	0	15	15
	total	21	17	38

Tabla 15: comparación de resultados de sangre directa versus sangre en papel de filtro en recién nacidos por PCRc (sat-DNA)

Tabla 16: Resultados de las amplificaciones para *T. cruzi* en grupo a)

ID	SD PCR en TR	PF PCR en TR	SD PCRc kDNA	SD PCRc Sat-DNA	PF PCRc- kDNA	PF PCRc Sat-DNA	Microscopía	Serología
1RN	+	+	+	+	+	+		EIA +
2RN	-	-	-	-	-	-	-	EIA-/IFI-
3RN	+	+	+	+	+	+	+	
4RN	+	+	+	+	+	+	+	
5RN	+	-	+	+	-	-		EIA+
6RN	-	-	-	-	-	-		EIA-/QML-
7RN	-	-	-	-	-	-		
8RN	-	-	-	-	-	-		
9RN	-	-	-	-	-	-		
10RN	-	-	-	-	-	-		
11RN	-	-	-	-	-	-		EIA-
12RN	-	-	-	-	-	-		
13RN	-	-	-	-	-	-		
14RN	-	-	-	-	-	-		
15RN	-	-	-	-	-	-		
16RN	-	-	-	-	-	-		EIA-
17RN	-	-	-	-	-	-		
18RN	+	+	+	+	+	-	+	
19RN	+	+	+	+	+	+	+	
20RN	+	+	+	+	+	+		EIA +
21RN	+	+	+	+	+	+		EIA +
22RN	+	+	+	+	+	+		EIA +
23RN	+	+	+	+	+	+		
24RN	1+/1-	-	-	-	-	-		
25RN	+	+	+	+	+	+		
26RN	-	-	-	-	-	-		
27RN	+	+	+	+	+	+		
28RN	+	-	+	+	+	+		EIA +
29RN	+	+	+	+	+	+		EIA +
30RN	1-/1+	-	-	-	-	-		EIA +
31RN	-	-	-	-	-	-		EIA -
32RN	+	+	+	+	+	+		
33RN	+	+	+	+	+	+		
34RN	-	-	-	-	-	-	-	
35RN	-	-	-	-	-	-	-	
36RN	-	-	-	-	-	-		EIA -
37RN	-	-	-	-	-	-		EIA -
38RN	+	+	+	+	+	+	+	

SD: sangre directa, PF: sangre en papel de filtro. EIA: Enzimoimmunoensayo, IFI: inmunofluorescencia indirecta, QML: Quimioluminiscencia

Evaluación en el grupo b) Adultos inmunosuprimidos con sospecha o riesgo de reactivación chagásica

En el grupo de pacientes analizados se estudiaron 34 muestras en paralelo (SD- papel de filtro) pertenecientes a 26 pacientes tomándose como referencia los resultados de las amplificaciones en SD

b)1) PCR en TR sangre directa versus PCR en TR sangre en papel de filtro:

El porcentaje de positividad obtenido en este grupo fue de 44.7% para las muestras directas y de 42.1 % para las muestras en papel de filtro.

3 muestras dieron positiva la PCR en TR en sangre directa y negativa la PCR en TR en papel de filtro, (A4/2, A6 y A22). SC: 81%, E: 100%, VPP: 1 y VPN: 0.86

Directos de sangre				
Papel de		-	+	total
filtro	-	18	3	21
	+	0	13	13
	total	18	16	34

Tabla 17: comparación de resultados de sangre directa versus sangre en papel de filtro en adultos por PCR en TR

b)2) k-DNA sangre directa versus k-DNA sangre en papel de filtro: hubo 3 muestras que dieron positiva la PCR en sangre directa y negativa la PCR en papel de filtro, (A4/2, A21/2 y A22). SC: 80%, E: 100%, VPP: 1 y VPN: 0.86

Directos de sangre				
Papel de		-	+	total
filtro	-	19	3	22
	+	0	12	12
total		19	15	34

Tabla 18: comparación de resultados de sangre directa versus sangre en papel de filtro en adultos por PCRc (k-DNA)

b)2) sat-DNA sangre directa versus sat-DNA sangre en papel de filtro hubo 3 muestras (ídem kDNA) que dieron positiva la PCR en sangre directa y negativa la PCR en papel de filtro, (A4/2, A21/2 y A22). SC: 80%, E: 100%, VPP: 1 y VPN: 0.86

Directos de sangre				
Papel de		-	+	total
filtro	-	19	3	22
	+	0	12	12
Total		19	15	34

Tabla 19: comparación de resultados de sangre directa versus sangre en papel de filtro en adultos por PCRc (sat-DNA)

En todos los casos se obtuvo amplificación del IAC en el rango de Ct esperados para la PCR en TR y de la β actina para la PCRc (ver Materiales y Métodos ITEM IX criterios de interpretación de resultados)

Tabla 20: resultados de las amplificaciones para *T. cruzi* en grupo b)

ID	Diagnóstico	SD PCR en TR	PF PCR en TR	SD PCRc kDNA	SD PCRc Sat-DNA	PF PCRc kDN A	PF PCRc Sat- DNA
A1	VIH/LOE/Chagas	+	+	+	+	+	+
A2	VIH /LOE/Chagas	+	+	+	+	+	+
A3 LCR	VIH /LOE/Chagas	+	+	+	+	+	+
A4 LCR	VIH /LOE/Chagas	+	+	+	+	+	+
A4/2	VIH /LOE/Chagas	+	-	+	+	-	-
A5	VIH /LOE/Chagas	-	-	-	-	-	-
A6	TMO	+	-	-	-	-	-
A7	TMO	+	+	+	+	+	+
A8	TMO	+	+	+	+	+	+
A6/2	TMO	-	-	-	-	-	-
A9	Tx Cardíaco	-	-	-	-	-	-
A10	Tx Cardíaco	-	-	-	-	-	-
A11	Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A12	Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A13	Tx Cardíaco	-	-	-	-	-	-
A14	Tx Hepático d+	-	-	-	-	-	-
A9/2	Tx Cardíaco	-	-	-	-	-	-
A11/2	Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A15	Tx	-	-	-	-	-	-
A12/2	Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A16	Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A17	Rch Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A18	TMO	+	+	+	+	+	+
A19	Tx hepático	-	-	-	-	-	-
A11/3	Tx. Hepático	-	-	-	-	-	-
A20	Tx Renal	-	-	-	-	-	-
A21	Tx Hepático	-	-	-	-	-	-
A21/2	Tx Hepático	+	+	+	+	-	-
A22	Tx Hepático	+	-	+	+	-	-
A23	Tx Hepático	+	+	+	+	+	+
A24	Tx.	+	+	+	+	+	+
A25	Tx.	+	+	+	+	+	+
A26	AR	+	+	+	+	+	+
A26/2	AR	+	+	+	+	+	+

Las muestras A3 y A4 corresponden a LCR de 2 pacientes diferentes, el resto de las muestras corresponden a sangre. LOE: lesión ocupante de espacio; TMO: transplante de médula ósea; Tx: transplante;d+: donante Chagas positivo; Rch: rechazo; AR: Artritis reumatoidea (SD: sangre directa, PF: papel de filtro)

En esta etapa se realizaron los cálculos de SC, E, VPP y VPN tomando como referencia los resultados obtenidos en las amplificaciones en sangre directa (ó LCR); como se observa en la tabla 21 en este grupo de pacientes las SC obtenidas para las 3 amplificaciones fue similar y no hubo discordancia entre duplicados en ningún caso. Las especificidades fueron del 100 % en todos los sistemas analizados

Papel de filtro	RN			Adultos		
	PCRc k- DNA	PCRc TC-sat	PCR en TR	PCRc k- DNA	PCRc TC-sat	PCR en TR
SC (%)	94	88	78.9	80	80	81
E (%)	100	100	100	100	100	100
VPP	1	1	1	1	1	1
VPN	0.95	0.91	0.83	0.86	0.86	0.86

Tabla 21: Comparación de SC, E, VPP y VPN para tres sistemas de detección molecular de *T. cruzi* en muestras de sangre seca en papel de filtro de pacientes RN y adultos

FASE 2:

Se evaluaron la sensibilidad y especificidad clínicas, pero en este caso se tomó como referencia el diagnóstico definitivo: Micrométodo o serología después de los 10 meses en recién nacidos y serología negativa para adultos. Como se observa en la tabla 22 la especificidad fue del 100 % (no hubo positivos de pacientes no infectados) y la sensibilidad clínica fue excelente sólo para PCR en TR de sangre directa, levemente inferior para ambas PCRc en sangre directa y alrededor de un 10% más baja para las detecciones en papel de filtro

Tabla 22: Sensibilidad y especificidad clínicas según diagnóstico convencional

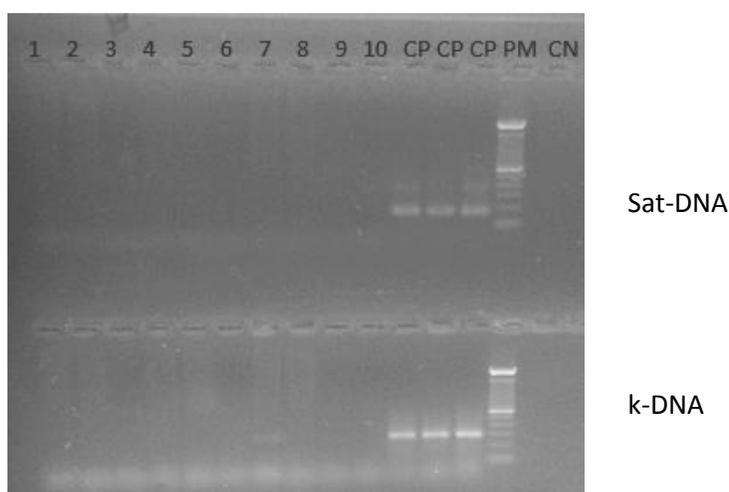
Diagnóstico final	(+ PCRc k-DNA		(+ PCRc sat-DNA		(+ PCR en TR	
	SD	PF	SD	PF	SD	PF
Infectados N= 13	12 (92.3%)	11 (84.6%)	12 (92.3%)	10 (76.9%)	13 (100%)	10 (76.9%)
No infectados N= 17	0	0	0	0	0	0

(+): Número de muestras positivas para cada técnica

Especificidad clínica:

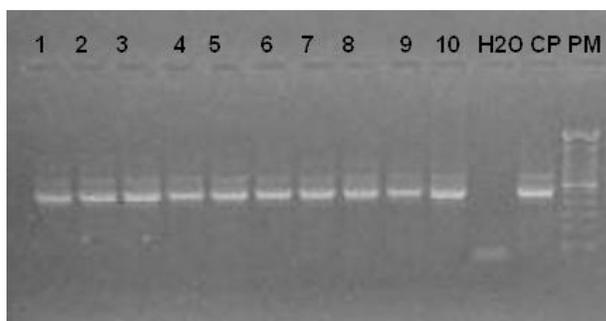
Se evaluó la especificidad clínica del método en 17 muestras de individuos no infectados: 10 muestras del grupo c) pacientes con serología negativa para Chagas admitidos en el Hospital Posadas y 7 muestras de bebés nacidos de mujeres chagásicas con diagnóstico serológico negativo confirmado a partir de los 10 meses de edad (Materiales y métodos ITEM XI) Todas las muestras mencionadas, resultaron negativas para ambos juegos de cebadores (el ejemplo figura 19), siendo positivas para el fragmento de β actina (Figura 20).

Figura 19: Estudio de especificidad en muestras seronegativas



10 muestras consecutivas de sangre seronegativas para *T.cruzi* colocadas en papel de filtro, a continuación 3 controles positivos (CP), seguidos por el marcador de peso molecular (PM) de 100 pb y al final el control negativo (CN). Arriba PCR sat-DNA, abajo PCR k-DNA

Figura 20: Controles de amplificación de muestras negativas



10 muestras consecutivas de sangre seronegativas para Chagas colocadas en papel de filtro/control negativo (agua)/ Marcador de peso molecular de 100 pb. Se observa banda de amplificación a la altura de 550 pb correspondiente a β actina humana

FASE 3)

Estudio de concordancia: Se aplicó índice Kappa generalizado a las tres técnicas de amplificación utilizadas: k- DNA (PCRc), sat-DNA (PCRc) y PCR en TR para las muestras del grupo a y grupo b, sangre directa y papel de filtro (ver Materiales y métodos, ITEM XIII)

Kappa: 0.9617 IC (95%): 0.9242- 0.9992 Valor p: 0.000

FASE 4)

Estudio sobre muestras de pesquisa neonatal: Se contó con cuatro tarjetas derivadas del sector de pesquisa neonatal de pacientes con Chagas congénito diagnosticado por microscopía y por PCRc en sangre directa (ver Materiales y métodos, ITEM VX). En todos los casos, las amplificaciones realizadas directamente de la tarjeta original fueron positivas y las cargas parasitarias variables como se detalla en la siguiente tabla, las tarjetas se preservaron en freezer entre 6 y 13 meses hasta su procesamiento.

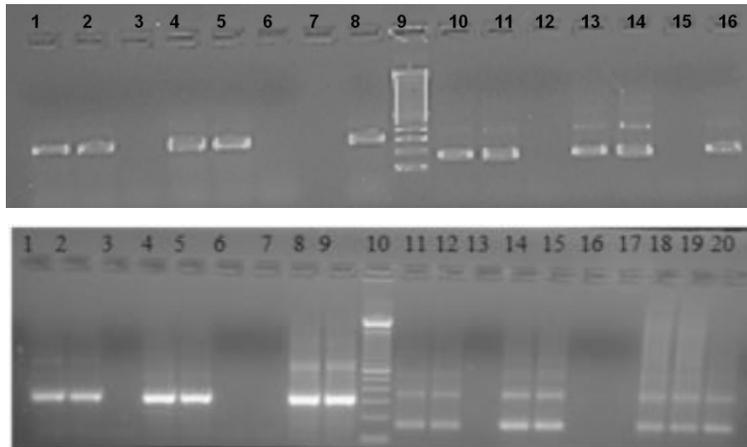
Tabla 22: Estudio de tarjetas de pesquisa neonatal de pacientes con Chagas congénito

ID	PCRc PDF- pn (k-DNA/sat- DNA)	PCR en TR PDF- pn (eq. par/ml)*	TPO
3RN	POS / POS	28	6 meses
4RN	POS / POS	4480	12 meses
19RN	POS / POS	5.5	5 meses
38RN	POS / POS	4160	13 meses

PCRc SD: PCRc de sangre directa, PCRc PDF- pn: PCRc en papel de filtro derivado de pesquisa neonatal, PCR en TR PDF- pn (eq. par/ml): PCR en TR en papel de filtro derivado de pesquisa neonatal cuantificado. TPO: tiempo de conservación de la muestra colocada en la tarjeta hasta su procesamiento en freezer de -20°C

*La carga parasitaria fue estimada a partir de una curva estándar de sangre con EDTA contaminada con parásitos de cultivo (sangre directa) extraída en forma similar a la del papel de filtro.

Figura 21: Amplificaciones de tarjetas de pesquisa neonatal de pacientes con Chagas congénito



Izquierda k-DNA, derecha sat-DNA. Arriba: Calles 1, 2, 10 y 11 paciente 3RN, calles 4, 5, 13 y 14 paciente 4RN, calle 7 control negativo, calle 8 y 16 control positivo, calle 9 marcador de peso molecular de 100 pb, calles 3, 6, 12 y 15 agua. Abajo: Calles 1, 2, 11 y 12 paciente 19RN, calles 4, 5, 14 y 15 paciente 38RN, calles 7 y 17 control negativo, calles 8, 9, 18, 19 y 20 control positivo, calle 10 marcador de peso molecular de 100 pb, calles 3, 6, 13 y 16 agua.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha evaluado la utilización de papeles de filtro del Programa Nacional de Pesquisa Neonatal para el diagnóstico molecular de la infección por *T. cruzi*

La toma de muestra en papel de filtro es sencilla, barata, requiere entrenamiento mínimo del personal, evita el uso de jeringas y utiliza escaso volumen de sangre, lo que favorece su uso en neonatos, además los papeles ocupan poco espacio durante su almacenaje y son fáciles de transportar y de manipular.

La elección del método de extracción con columnas comerciales previa incubación de la sangre inmovilizada en papel de filtro con buffer de lisis de tejido se debió a que se obtuvo mejor sensibilidad. En efecto, las columnas concentran y purifican los ácidos nucleicos en la membrana de fibra de vidrio y la incubación previa con buffer de lisis de tejido permite la liberación adecuada del material genético impregnado en el papel de filtro y la eliminación efectiva de inhibidores ya que, como se demostró en la figura 11 el papel de filtro contiene sustancias que inhiben la reacción de PCR. Las columnas comerciales han sido utilizadas anteriormente con éxito en la extracción de ADN para la identificación de especies de Plasmodium en muestras en papel de filtro (Tajebe y col., 2014; Carnevale, 2010). Al realizar los ensayos para determinar el método de extracción más adecuado se utilizó para la toma de muestra un sacabocados de 3 mm de diámetro, pero luego se optó por cortar toda la mancha de sangre con tijera limpiando entre muestras con lavandina diluída y secando en el mismo papel de filtro ya que resulta más sencillo y económico.

Las técnicas de amplificación génica utilizadas para la detección de ADN de *T. cruzi* en esta tesis fueron: PCR convencional para la detección de ADN del minicírculo del kinetoplasto de *T. cruzi* (k- DNA), PCR convencional para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* (sat-DNA) y PCR en tiempo real multiplex con sondas TaqMan (Duffy y cols., 2013) que amplifica la región de ADN satélite de *T. cruzi* y simultáneamente un control interno (IAC). Al realizar un estudio de concordancia aplicando el test estadístico Kappa generalizado a todas las muestras analizadas se obtuvo una concordancia “Muy Buena” según la escala propuesta por Landis y Koch (Landis y Koch, 1977), es decir, que la PCR en TR Multiplex, la PCRc k-ADN y la PCRc sat-ADN podrían ser utilizadas en forma indistinta en caso de contar con sólo una opción. Esto coincide, en parte, con un trabajo presentado por Ramírez y col. en el que se obtuvo una “Buena” concordancia (coeficiente Kappa de 0.691) al comparar amplificaciones utilizando secuencias dirigidas a Kinetoplasto

y a ADN satelital por PCR en TR en pacientes con Chagas crónico en sangre entera con guanidina- EDTA (Ramírez y col. 2015) y también con una publicación de Qvanstrom y col. que compara tres amplificaciones para ADN de *T. cruzi* (sat-DNA, k- DNA y 18 S rRNA) por PCR en TR con idénticos resultados en el 94 % de las muestras (Qvanstrom y col. 2012)

El LoD determinado en papel de filtro por PCRc fue de 8.97 y 10.33 eq. par/ml para k-DNA y sat-DNA respectivamente siendo este el primer reporte de límite de detección molecular de *T. cruzi* en muestras de sangre seca en papel de filtro. Estos valores representan aproximadamente una concentración de un orden mayor a la del LoD de sangre directa y se correlaciona con la cantidad de muestra de partida: 25 µl de sangre (una gota) colocada en papel de filtro versus 200µl de sangre con EDTA. El valor de sensibilidad analítica determinado por PCR en TR fue mayor a los LoD obtenidos por PCRc (tanto para sangre directa como en papel de filtro). Ya que para PCR en TR sólo se realizó una amplificación por duplicado, quedaría por evaluar un número mayor de réplicas para poder determinar estadísticamente el LoD correspondiente, siguiendo las guías de CLSI (Burd, 2010).

Las curvas realizadas en masa de ADN corroboran los resultados de sensibilidad analítica obtenidos con las curvas realizadas a partir de parásitos, considerando que un parásito de *T. cruzi* contiene aproximadamente 200 fg de ADN.

Las sensibilidades analíticas publicadas para sangre entera con Guanidina- EDTA extraídas con columnas comerciales fueron de 0.23 eq. par/ml para k- DNA por PCR en TR, el cual desciende a 0.16 eq. par./ml previo hervor (Ramírez y col. 2015); para sat-DNA se reportó un límite de detección de 0.7 eq. par./ml por PCR en TR (sangre entera con Guanidina- EDTA) el cual desciende a 0.46 eq. par./ml previo hervor (Duffy y col. 2013) y se han reportado experimentos con límites de detección tan bajos como 5×10^{-3} eq. par/ml para k- DNA (Schijman y col, 2011). En el presente trabajo, los métodos de PCR estandarizados para sangre directa presentaron un límite de detección por encima de estos valores (0.5 eq. par/ml para PCR en TR y cercano a 1 eq. par/ml para ambas PCRc ó 0.1 fg ADN / µl) para los tres sistemas evaluados. Para aumentar la sensibilidad se podría realizar una incubación previa de la sangre con Hidrocloruro de Guanidina 6 M – EDTA 0.2 M para lisar el parásito y favorecer la liberación del ADN. Una alternativa posible es utilizar la

capa leucocitaria post centrifugación por Gradiente de Ficoll-Hypaque (Buffy coat) para realizar la extracción del ADN. El uso de *buffy coat* ha presentado mayor sensibilidad en la detección molecular de *T. cruzi* por PCR en sangre directa (Qvanstrom y col., 2012) y podría validarse en papel de filtro. En un estudio de tripanosomiasis africana se ha reportado que realizar la lisis de la sangre previo a la colocación en el papel de filtro y la utilización de más cantidad de discos han mejorado la sensibilidad (Ahmed y cols., 2011). Además, la utilización de resinas Chelex-100 ha resultado con éxito para la extracción de muestras de sangre seca en papel de filtro para el estudio de *T. brucei* y *T. congolense* en ganado (Katakura y cols., 1997).

Los límites de detección obtenidos luego del procesamiento de papel de filtro siguen siendo de todos modos superiores a la capacidad de detección del parásito por las metodologías parasitológicas clásicas como el microhematocrito o su variante en tubos Eppendorf, conocida como micrométodo (De Rissio y col., 2009), considerado el estándar de oro. En un trabajo publicado por Freilij y colaboradores en el año 1983 se determinó la sensibilidad analítica del microhematocrito entre 500 y 1000 parásitos /ml (Freilij y col., 1983) y en 2005 se publicó una modificación de la técnica de Freilij que logró detectar hasta 40 parásitos /ml. (Torrico y col., 2005). Estas metodologías tienen bajo costo, requieren insumos básicos de laboratorio, personal capacitado y es fundamental que el parásito esté vivo para ser reconocido por sus movimientos característicos, por lo tanto la muestra se debe procesar dentro de las 8 horas de realizada la extracción sanguínea (Torrico y col., 2005); esto no siempre es posible, especialmente si se necesita derivar desde zonas alejadas y resulta imposible analizar muestras que fueron guardadas por más de 24-48hs.

Otra de las limitaciones del microhematocrito o micrométodo es la dependencia del operador, en cuanto a su experiencia para identificar los tripanosomas en la muestra.

Como se demostró en este trabajo hemos podido detectar ADN de *T. cruzi* en muestras de sangre seca de las tarjetas de pesquisa neonatal guardadas en freezer por más de un año. En otros trabajos ya se ha documentado la estabilidad del ADN de tarjetas de pesquisa neonatal para el estudio retrospectivo de enfermedades infecciosas congénitas, como la detección molecular de Citomegalovirus en tarjetas guardadas por 12-18 años

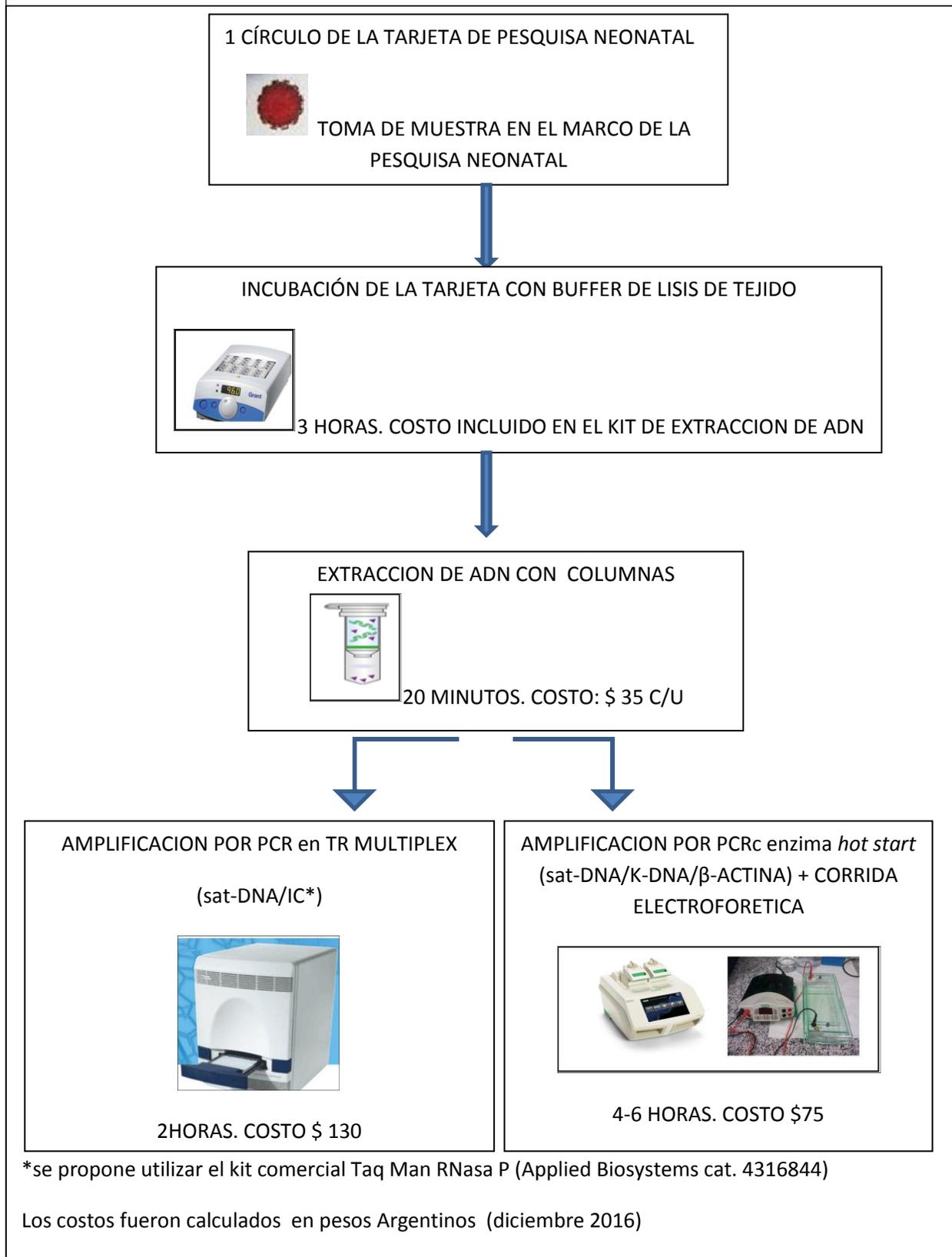
(Johansson, 1997) o en el caso de Toxoplasmosis en tarjetas conservadas por 29 meses (Marangoni y col., 2014).

Las muestras fijadas a dicho soporte y extraídas con las columnas no presentaron inhibición de la PCR demostrado por la amplificación del control de β -actina humana en la PCRc y del control interno (IAC) en la PCR en TR, ni tampoco interferencias en las muestras seronegativas estudiadas. Aunque en este trabajo de tesis, hemos utilizado el IAC como control interno de amplificación en la PCR en TR, estimamos que a los fines de la práctica clínica diaria, será más conveniente utilizar como estándar interno, la amplificación de un gen endógeno humano, tal como el de la RNAsa P. Existe un kit comercial basado en sondas TaqMan que puede utilizarse a tal efecto (TaqMan RNase P Control reagents Kit, Applied Biosystems, Cat 4316844)

Es importante tener en cuenta el riesgo de la contaminación con ADN entre papeles de filtro contiguos, según se ha observado durante la realización de este trabajo. Por lo tanto, las tarjetas con muestra deben mantenerse separadas, lo que puede lograrse colocándolas en sobres de papel de aluminio individuales con desecante hasta su procesamiento. La transferencia de ADN entre papeles de filtro almacenados en contacto ya había sido reconocida en estudios previos (Johansson y col., 1997)

El siguiente esquema muestra el Flujo de trabajo necesario para el diagnóstico molecular de infección por *T.cruzi* empleando papel de filtro, desarrollado en el marco de esta Tesis.

Esquema 4; costos y tiempos requeridos para la detección molecular de *T. cruzi* en muestras de sangre seca de pesquisa neonatal para diagnóstico de Chagas congénito



Análisis de muestras clínicas:

La sensibilidad a obtenida para muestras de sangre en papel de filtro, tomando como referencia los resultados en sangre directa para cada uno de los métodos de amplificación realizados, resultó en un rango entre 80 y 81% en casos adultos con riesgo de reactivación chagásica por inmunosupresión y entre 78.9 y 94 % en recién nacidos de mujeres chagásicas, siendo la más elevada la PCRc de kDNA en el grupo de recién nacidos. Asimismo, en este grupo la sensibilidad clínica para detección de Chagas congénito, tomando como estándar de oro el diagnóstico convencional, resultó entre 76.9 y 84,6%, siendo también más elevada en el caso de PCRc para kDNA. Dado este resultado, sería interesante en el futuro, ensayar la PCR en TR para kDNA en muestras impregnadas en papel de filtro.

El nivel de sensibilidad obtenido permitiría la detección temprana de infección en neonatos, debido a que está reportado que los niveles de carga parasitaria en recién nacidos con Chagas congénito son superiores a 1 par/ml (Bua y col., 2013) con promedios incluso mayores (Virreira y col., 2007; Bua y col., 2012). Asimismo, los pacientes reactivados también presentan niveles de parasitemia que serían detectables por esta metodología (Cura y col., 2013, de Freitas, 2011). En este sentido, ha sido nuestro mayor interés evaluar el uso de papel de filtro en estas poblaciones

En el caso del diagnóstico neonatal de Chagas congénito, un resultado positivo favorecería la instauración del tratamiento antes de que el bebé sea dado de alta de la maternidad, tratamiento que es altamente efectivo en los primeros meses de vida y con bajos niveles de toxicidad (Bianchi y col., 2015; González-Tomé y col., 2013). Por otro lado, si el método microscópico de rutina resulta negativo, la confirmación del diagnóstico se debe realizar a los 10 meses, pero en la práctica no siempre se realiza por dificultades socio-económicas de los adultos responsables y del propio sistema de salud. En el caso de estar infectados y no completarse el estudio, los niños no reciben tratamiento, evolucionando la infección a la fase crónica con el riesgo de manifestaciones clínicas severas, y en el caso de las niñas, de transmitir a su vez la infección a su descendencia, al alcanzar su edad reproductiva. En este trabajo con muestras de 38 recién nacidos se pudo

constatar la serología hasta la fecha en un 39.5 % de los casos, encontrándose el resto en seguimiento.

Además, el estudio de las tarjetas de pesquisa neonatal de pacientes con diagnóstico de Chagas congénito ha permitido confirmar la transmisión vertical del *T. cruzi* en forma retrospectiva por los tres métodos de amplificación ensayados. En el caso de la PCR en TR, se pudo además estimar la carga parasitaria mostrando la heterogeneidad de carga entre recién nacidos (5,5 a 4680 eq.par/ml) obtenidos en tarjetas conservadas entre 5 y 13 meses desde la toma de muestra.

En el caso de la infección por VIH la OMS recomienda el uso de papel de filtro en países con recursos limitados para la toma de muestras y seguimiento de la infección cuando la recogida de sangre por venopunción, almacenamiento y transporte a laboratorios de referencia conlleva dificultades a nivel práctico (WHO, 2010). Esto mismo podría trasladarse a la enfermedad de Chagas, cuya mayor prevalencia ocurre en países en vías de desarrollo, como la Argentina, en donde se calculan alrededor de 2 millones de infectados, especialmente en zonas endémicas, de escasos recursos donde los diagnósticos suelen ser tardíos o nulos, y donde la mayor incidencia de la enfermedad de Chagas se produce antes de los 14 años, sobre todo en menores de 5 años (Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi*, Ministerio de Salud de la Nación, 2012).

Es interesante notar que se logró detectar ADN de *T. cruzi* en muestras de líquido cefalorraquídeo de pacientes VIH reactivos con chagoma cerebral, utilizando como soporte papel de filtro. Como se ha demostrado anteriormente, el LCR almacenado en papel de filtro ha resultado efectivo también para el estudio de meningitis bacterianas (Elliot y col., 2013; Peltola y col., 2010).

La especificidad en las muestras evaluadas en papel de filtro en todos los casos fue del 100%, la incorporación de este soporte no ha alterado los resultados de las amplificaciones generando falsos positivos.

En el marco de esta tesis se ha trabajado con algunas muestras facilitadas por la Dra. Alba Abras del Hospital Sant Pau de Barcelona a las que se les detectó *T. cruzi* en sangre directa y en papel de filtro por las metodologías descriptas. En 5 de dichas muestras se

realizó la identificación de las UDTs de *T. cruzi*, resultando en cuatro de ellas TcV y en una se identificó una infección mixta de TcV+Tc II/VI, siendo este el primer caso de infección mixta simultánea reportado (Abras y col, 2016, en prensa). Estas muestras pertenecían a niños nacidos en España con diagnóstico de Chagas congénito, hijos de madres inmigrantes bolivianas con serología positiva para Chagas. La identificación se realizó aplicando dos algoritmos secuenciales basados en marcadores moleculares desarrollados en el LaBMECh (Burgos y col., 2010; 2007) Queda pendiente para futuras investigaciones realizar la identificación de las UDTs de *T. cruzi* en el resto de las muestras positivas en papel de filtro y poner a punto las técnicas de identificación de UDTs en el Hospital Prof. A. Posadas.

En el año 2016 se ha publicado un trabajo en el que se recogen muestras de sangre en tarjetas de papel de filtro y se realiza una PCR convencional que luego es visualizada en geles de poliacrilamida teñidos con plata; este trabajo demuestra la utilidad de este sistema para el seguimiento post tratamiento en niños de una comunidad Toba (Sánchez y col., 2016). Sin embargo, los autores no han descrito la validación analítica del método. Anteriormente, se ha documentado evidencia sustancial que demuestra la utilidad del papel de filtro con otros protozoos hemáticos y tisulares relacionados a *T. cruzi*. Blanquiceth y col. evidenciaron infección por *Plasmodium* con parasitemias por debajo del nivel microscópico en mujeres gestantes de regiones endémicas utilizando una PCR en muestras de sangre seca en papel Whatman extraída con resinas Chelex (Blanquiceth y col., 2014). Viana y colaboradores compararon dos metodologías de extracción de ADN de sangre en papel de filtro para realizar una PCR anidada para diagnóstico de Malaria encontrando mejores resultados en las extracciones de ADN realizadas con saponina- Chelex que con un método de lavado (agua destilada, solución salina y filtrado con sistema de filtros Millipore), un motivo posible para la falla en la detección de algunas muestras positivas se debe al hecho que el método de lavado no eliminó inhibidores adecuadamente (Viana y col., 2010). Además se destaca la posibilidad de identificar correctamente especies de *Plasmodium* (lo que no es posible por microscopía) e incluso infecciones mixtas (Lopez y col., 2011, Viana y col., 2010). Se han publicado estudios moleculares de tripanosomas en ganado realizados con sangre seca en papel de filtro que demuestran la importancia de poder identificar especies y las infecciones mixtas por *Trypanosoma vivax* y *T. evansi* en Bolivia (Gonzalez y col., 2003) y *T. congolense* y *T. brucei* en Zambia (Katakura y col.,

1997). En Uganda, Ahmed y colaboradores realizaron un estudio de *Trypanosoma brucei* en ganado comparando distintas metodologías de extracción del ADN de tarjetas FTA en el que recomienda la utilización de resinas de intercambio iónico Chelex-100 como mejor opción (Ahmed y col., 2011) En el estudio de leishmaniasis cutánea la impresión de lesiones de papel de filtro para la toma de muestras y luego la extracción del ADN por el método de fenol- cloroformo para el diagnóstico molecular también ha reportado resultados satisfactorios tanto para lesiones primarias (Boggild y col., 2010) como para úlceras secundarias infectadas con bacterias (Boggild y col., 2011) proponiendo una alternativa sensible, tolerable y no invasiva para la toma de muestra de lesiones.

En todos los casos la visualización microscópica es el método de referencia, pero en todos estos trabajos destacan la mayor sensibilidad de la PCR y la posibilidad de identificar especies e infecciones mixtas.

La utilización del papel de filtro como soporte para el transporte y conservación de muestras de sangre podría tener utilidad además con fines epidemiológicos y en programas de control de vectores, en casos de sospecha de Chagas agudo por infección vectorial o brotes orales y en todo aquel que requiera un estudio molecular de *T. cruzi* y la muestra deba ser derivada a centros de referencia alejados del sitio de toma de muestra.

Ante la necesidad de contar con un sistema de diagnóstico de Chagas integrado a la atención médica de rutina que cuente con alta sensibilidad y especificidad, idealmente *point of care* o que no requiera cadena de frío para su derivación (Porrás y cols, 2015), este trabajo aporta información que puede ser de utilidad para mejorar el sistema de diagnóstico de esta enfermedad “desatendida”.

El análisis de una casuística mayor permitirá validar esta metodología en distintas situaciones clínicas y eco-epidemiológicas.

CONCLUSIONES

La extracción de ADN de muestras impregnadas en papel de filtro utilizando columnas comerciales previa incubación con buffer de lisis de tejido demostró mejor rendimiento y una efectiva eliminación de los inhibidores. Además son sencillas de usar y accesibles.

Las muestras en papel de filtro para estudios de ADN se contaminan si se guardan apiladas.

La determinación del límite de detección aplicando análisis Probit fue calculado para las PCRc dirigidas a k-DNA y sat-DNA arrojando una diferencia de un orden en concentración mayor para las muestras impregnadas en papel de filtro respecto a las de sangre directa.

La sensibilidad analítica de la PCR en TR para sat-DNA resultó mayor que la de la PCR convencional en papel de filtro.

Los valores de sensibilidad analítica obtenidos en papel de filtro (incluso para PCRc) serían adecuados para su aplicación a la detección de *T. cruzi* en pacientes con Chagas agudo vectorial, Chagas congénito o reactivación chagásica. En el caso de pacientes crónicos no sería una técnica recomendable ya que suelen presentar parasitemias menores a 1 par/ml, y por lo tanto la sangre directa resulta la muestra más adecuada.

La sensibilidad promedio de las tres técnicas de PCR evaluadas en las muestras de sangre seca en papel de filtro tomando como referencia los resultados obtenidos en las mismas amplificaciones con sangre directa fue 86.97% en el grupo de recién nacidos, hijos de madres seropositivas para Chagas y en el grupo de adultos inmunocomprometidos fue de 80.33%. La sensibilidad clínica promedio en recién nacidos fue del 79.5%, tomando como estándar de oro el diagnóstico convencional. La especificidad fue 100% en las poblaciones analizadas.

La concordancia entre las tres técnicas fue “Muy Buena”

Se pudo demostrar además en forma retrospectiva el diagnóstico molecular de Chagas congénito directamente de tarjetas originales del programa de pesquisa neonatal tomadas de sangre de talón de recién nacidos y determinar cargas parasitarias aproximadas al momento del nacimiento.

ANEXO: Procedimiento para la correcta forma de tomar las muestras de sangre en las tarjetas de papel de filtro para pesquisa neonatal

Extraído de: Manual de procedimientos del “Programa Nacional de Fortalecimiento de la Detección Precoz de Enfermedades Congénitas”, agosto 2011

Las muestras de sangre deberán tomarse mediante punción del talón a todo niño recién nacido vivo entre las 48 horas y el 5° día de vida. No obstante no existe límite superior de edad para la exclusión del procedimiento de pesquisa neonatal. Por esta razón, si por cualquier motivo la muestra no fue oportunamente obtenida, ésta deberá ser tomada, aún superado el 5° día de vida, ya que su valor diagnóstico está conservado y el niño, aún con un eventual diagnóstico demorado, se verá beneficiado con la pesquisa neonatal. Se debe hacer constar fehacientemente, en la tarjeta, las horas de vida del recién nacido.

Técnica Confirmar la identidad del infante y proceder al llenado completo del formulario impreso en la tarjeta de recolección sanguínea, con letra clara y legible. Previo al proceso de extracción sanguínea se procederá al lavado de manos. Se deberán usar guantes (sin polvo), los que se deben cambiar y descartar entre infante e infante. La toma de muestra se realizará por punción del talón del recién nacido, en la zona plantar externa posterior. La punción nunca se debe realizar en el área central del talón por los posibles riesgos de lesionar nervios, tendones y cartílago presentes en dicha zona. Es recomendable entibiar el sitio de la punción con agua tibia (a fin de no quemar la piel), o bien masajear el talón. Esto ayuda a la vasodilatación de la zona, facilitando la salida de la sangre. Al colocar la pierna del niño a un nivel más bajo que el corazón, se aumenta la presión venosa, lo que ayuda a obtener una mejor gota de sangre. Limpiar la zona de punción con alcohol. El exceso de alcohol se debe secar con una gasa estéril o secar al aire, ya que este líquido hemolisa y diluye la sangre, afectando el resultado final. Realizar la punción utilizando una lanceta estéril, descartable, con una punta de 2 mm de profundidad. La primera gota de sangre no debe ser aplicada al papel de filtro y debe ser limpiada con gasa estéril. Posteriormente, se debe dejar formar en el talón una gota abundante, la que debe ser recogida directamente del talón a la tarjeta, colocando una única gota de sangre por círculo. Se debe evitar el apilamiento o aplicación de sucesivas gotas en un mismo punto, ya que esta práctica puede producir muestras no uniformes o sobreimpregnadas que alteran el

dosaje. Llenar completamente cada círculo con una gota en cada uno, verificando que la sangre sea visible al reverso de la tarjeta. Para ayudar a la formación de la gota de sangre en el talón del bebé, el extraccionista podrá aplicar una presión suave e intermitente con el pulgar. Este procedimiento no debe ser muy intenso a fin de no contaminar (por hemólisis) o diluir la muestra con líquidos tisulares. Evite presionar el talón contra la tarjeta, ya que altera la absorción de la sangre. Una vez recolectada la muestra de sangre, elevar el talón del recién nacido por sobre el cuerpo y presionar la zona de punción con una gasa limpia, hasta que deje de sangrar. Colocar una cinta adhesiva, si es necesario. La toma de muestra de sangre venosa obtenida del dorso de la mano del recién nacido, no es una práctica recomendada. Sin embargo, es aceptable cuando al Recién Nacido se le debe tomar otro examen de sangre, (en ese caso usar una aguja 25/G), si cumple con la edad (horas de vida 48 hs - 5 días).

Calidad de la muestra Se debe asegurar que cada círculo de la tarjeta quede completamente cubierto con una cantidad uniforme de sangre a fin de que la calidad y confianza de los ensayos no se vea comprometida por problemas en la muestra.

Precauciones a tomar con la tarjeta y el papel filtro Se deberá dejar secar cada tarjeta colocándola en posición horizontal (para que la gota de sangre se distribuya de manera uniforme), y dejándola reposar a temperatura ambiente, al menos por 4 horas, lejos de la luz directa del sol. Mientras transcurre el secado de las tarjetas, éstas no deben ser apiladas, evitando que una tarjeta toque la otra a fin de prevenir la contaminación cruzada Existen gradillas de cartulina ranuradas, conformadas de modo que pueden acomodar las tarjetas durante su secado, siendo conveniente utilizar las mismas o elementos semejantes que permitan el correcto secado y NUNCA se deben secar las tarjetas por medios artificiales (hornos microondas, estufas y otros). Una vez secas (NUNCA ANTES), colocarlas ordenadamente dentro de una caja destinada a este propósito y almacenar en lugar limpio, alejadas de soluciones antisépticas u otro material que pudiera contaminar o humedecer las tarjetas. Es conveniente apilarlas rotadas 180° alternadamente entre sí, de modo que la zona de las gotas de sangre no tome contacto directo con la zona correspondiente en la tarjeta inmediatamente superior e inferior

No se requiere que las tarjetas sean almacenadas en heladera siempre y cuando sean enviadas al laboratorio dentro de los dos días que fueron tomadas siempre y cuando se queden en un lugar seco y fresco sin exposición al calor o la luz solar. Colocarlas en el sobre en que se enviaran. Si por cualquier motivo se demora el envío, proteger con un plástico herméticamente cerrado y guardar en la heladera hasta el envío. Evitar que se afecte la calidad de la muestra.

Registro y transporte: Antes de enviar las muestras de sangre, estas deberán ser registradas en un libro destinado a tal efecto, ensobrada y enviada al laboratorio de proceso a la brevedad posible, mediante correo, sistema de mensajería, ambulancia, etc. Idealmente, los envíos se deberían realizar en forma diaria, aunque es aceptable la organización de un sistema con no menos de 2 a 3 envíos semanales (tener en cuenta la edad del paciente al momento en que recibirá los resultados). Si, por cualquier motivo, se demora el envío se debe proteger con un plástico herméticamente cerrado y guardar en la heladera hasta el envío. Evitar que se afecte la calidad de la muestra. Durante su almacenamiento y/o transporte, se debe evitar que las muestras de sangre sean expuestas a altas temperaturas, humedad y a la luz solar directa, por ser estas condiciones potencialmente responsables del deterioro de los componentes a analizar.

Informe y entrega de resultados. Para la entrega de los resultados, cada provincia instrumentará en forma eficiente una metodología de manera que asegure que cada madre tenga el resultado de las determinaciones, el pediatra conozca el resultado y lo asiente en la historia clínica. En la libreta del Recién Nacido deberá figurar la toma de la muestra y el resultado. El laboratorio de procesamiento debe considerar como opciones importantes enviar los resultados a los centros asistenciales por vía postal/ fax y por correo electrónico, incorporando en el apartado Logística del Manual provincial, la metodología a emplear.

REFERENCIAS

Abdelwhab, E., Lueschow, D., Harder, T., Hafez, H. (2011) The use of FTA (R) filter papers for diagnosis of avian influenza virus. *J Virol Methods*.174(1–2):120–2.

Abras, A., Gallego, M., Muñoz, C., Juiz, N., Ramírez, JC., Cura, C., Tebara, S., Fernández, A., Pinazo, MJ., de la Torre, L., Posada, E., Navarro, F., Espinal, P., Ballart, C., Portús, M., Gascón, J., Schijman, AG.(2016) Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain) *Journal: Parasitology International*. En prensa.

Ahmed, H. A., MacLeod, E. T., Hide, G., Welburn, S. C., & Picozzi, K. (2011).The best practice for preparation of samples from FTA® cards for diagnosis of blood borne infections using African trypanosomes as a model system.*Parasites & Vectors*, 4, 68.

Andriamandimby, S., Heraud, J., Randrianasolo, L., Rafisandratantsoa, T., Andriamamonjy, S., Richard, V. (2013) Dried-blood spots: a cost-effective field method for the detection of chikungunya virus circulation in remote areas. *PLoS Negl. Trop.* 7(7):e2339

Ávila, H., Sidman, D., Cohen, L., Millikan, R., Simpson L. (1991) Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates:diagnosis of chronic Chagas disease. *Mol Biochem Parasitol.* 48:211–222.

Barnabé, C., Brisse, S., Tibayrenc, M. (2000) Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach.*Parasitology* 120, 513–526.

Barnabé C, Mobarec HI, Jurado MR, Cortez JA, Brenière SF.(2016) Reconsideration of the seven discrete typing units within the species, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. *Infect Genet Evol.*;39:176–86.

Bertagnolio,S., Parkin, N., Jordan, M., Brooks, J., Garcia-Lerma, J. (2010). Dried blood spots for HIV-1 drug resistance and viral load testing: a review of current knowledge and WHO efforts for global HIV drug resistance surveillance. *AIDS Rev* .12:195–208.

Bianchi, F., Cucunubá, Z., Guhl, F., González, NL., Freilij, H. *et al.*(2015) Follow-up of an Asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia.*PLoS Negl Trop Dis* 9(2): e0003465.

Blanco, S., Segura, E., Gürtler, R.(1999) Control of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina.*Medicina (B Aires)* 59 (Suppl 2): 138–142.

Blanquiceth, Y., Murillo Gómez, O., Maestre, A. & Corredor, M. (2014). Detección de casos submicroscópicos de *Plasmodium* spp., utilizando técnicas clásicas y moleculares en pacientes gestantes de Córdoba, Colombia. *Iatreia*, 27(3), 278-289.

Blasco G., Nuñez, M., Cruceyra B., Magdaleno, D., García B. (2011) Enfermedad de Chagas y embarazo. *Revista chilena de obstetricia y ginecología*, 76(3), 162-168.

Boggild AK, Valencia BM, Espinosa D, Veland N, Ramos AP, Arevalo J, Llanos-Cuentas A, Low DE. (2010) Detection and species identification of *Leishmania* DNA from filter paper lesion impressions for patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis.*;50:e1–e6

Boggild, A. K., Ramos, A. P., Valencia, B. M., Veland, N., Calderon, F., Arevalo, J., ...Llanos-Cuentas, A. (2011). Diagnostic Performance of Filter Paper Lesion Impression PCR for Secondarily Infected Ulcers and Nonulcerative Lesions Caused by Cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(3), 1097–1100.

Boletín Integrado de Vigilancia / Año III - N° 91 (2011) Ministerio de salud de la Nación

Boppana, S., Ross, S., Novak, Z., Shimamura, M., Tolan R., Palmer, A., Fowler, K. (2010). Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 303(14), 1375-1382.

Brasil, P.E., De Castro, L., Hasslocher-Moreno, A., Sangenis, L., Braga, J. (2010) ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis.*;10:337.

Brisse, S., Barnabe, C., Tibayrenc, M. (2000) Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol* 30, 35-44.

Britto, C., Cardoso, M., Vanni, C., Hasslocher-Moreno, A., Xavier, S., Oelemann, W., Santoro, A., Pirmez, C., Morel, C., Wincker, P. (1995) Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 110:241–247.

Britto, Constança Carvalho. (2009). Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(Suppl. 1), 122-135.

Bua J, Volta BJ, Velazquez EB, Ruiz AM, Rissio AM, Cardoni RL. (2012) Vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection: quantification of parasite burden in mothers and their children by parasite DNA amplification. *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 106(10):623–8

Bua, J., Volta, B. J., Perrone, A. E., Scollo, K., Velázquez, E. B., Ruiz, A. M., ... Cardoni, R. L. (2013). How to Improve the Early Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Relationship between Validated Conventional Diagnosis and Quantitative DNA Amplification in Congenitally Infected Children. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 7(10), e2476.

Burd, EM.(2010) Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases.Clin Microbiol Rev. Jul;23(3):550-76. Review.

Burgos, J. M., Altcheh, J., Bisio, M., Duffy, T., Valadares, H. M., Seidenstein, M. E., *et al.* (2007). Direct molecular profiling of minicircle signatures and lineages of *Trypanosoma cruzi* bloodstream populations causing congenital Chagas' disease. *Int. J. Parasitol.* 37: 1319-27.

Burns, MJ., Nixon, GJ., Foy, CA., Harris, N. (2005) Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol*;5:31.

Cabaleiro, L., Torrico, R., Kidd, E., Roldán, V., Loreti, C., Golikow, M., Jacobo, M., Torales, G., Montenegro, G., Irurtia, C. (2015) Enfermedad de Chagas: reactivación en sistema nervioso central (SNC) en pacientes inmunocomprometidos. Congreso SADI 2015 Reporte de casos {ABS}-559 Disponible en <http://www.sadi2016.com.ar/trabajos/ABS-559.pdf>

Calderón-Arguedas, O., Chinchilla, M., García, F., & Vargas, M. (2001). Preferencias alimentarias de *Triatoma dimidiata* (Hemiptera: Reduviidae) procedente de la meseta central de Costa Rica a finales del siglo XX. *Parasitología al día*, 25(3-4), 78-81.

Campino, L., Cortes, S., Pires, R., Oskam, L., Abranches, P.(2000) Detection of *Leishmania* in immunocompromised patients using peripheral blood spots on filter paper and the polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 19:396–398.

Canals, L., Ehrenfeld, H.&Cattan A (2000). Situación de *Mepraia spinolai*, vector silvestre de la enfermedad de Chagas en Chile, en relación con otros vectores desde la perspectiva de sus fuentes de alimentación. *Revista médica de Chile*, 128(10), 1108-1112.

Cardinal, M.V., Lauricella, M.A., Ceballos, L.A., Lanati, L., Marcet, P.L., Levin, M.J., *et al.*, 2008.Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina.*Int. J. Parasitol.* 38, 1533–1543.

Carlier, Y., Torrico, F., Sosa-Estani, S., Russomando, G., Luquetti, A., Freilij, H., *et al.* (2011) Congenital Chagas Disease: Recommendations for Diagnosis, Treatment and Control of Newborns, Siblings and Pregnant Women. *PLoS Negl Trop*

Carnevale S, Ángel S.,Director (2002) TESIS. "Diagnóstico de paludismo por *Plasmodium vivax* utilizando secuencias repetitivas de ADN parasitario. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, UBA. Doctor en Ciencias Biológicas

Carrasco, H. J., Segovia, M., Londoño, J. C., Ortegoza, J., Rodríguez, M., & Martínez, C. E. (2014). *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the Metropolitan District of Caracas, Venezuela. *Parasites & Vectors*, 7, 602.

Castro, J., Díaz de Toranzo, E. (1988) Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Biomedical and Environmental Science* .1: 19-33.

CDC.Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease) Disponible en <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>

Chaisomchit, S., Wichajarn, R., Janejai ,N., Chareonsiriwatana, W. (2005). Stability of genomic DNA in dried blood spots stored on filter paper. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 36:270–273

Chiari, E.(1999). Chagas disease diagnosis using polymerase chain reaction, hemoculture and serologic methods. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(Suppl. 1), 299-300.

Coura, J., Junqueira, A., Fernandes, O., Valente, S., Miles, M. (2002) Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol* 18, 171-176.

Cura, C. I., Lattes, R., Nagel, C., Gimenez, M. J., Blanes, M., Calabuig, E., Iranzo, A., Barcan, L. A., Anders, M. and Schijman, A. G. (2013) Early Molecular Diagnosis of Acute Chagas Disease After Transplantation With Organs From *Trypanosoma cruzi*-Infected Donors. *American Journal of Transplantation*, 13: 3253–3261.

De Freitas, V. L. T., da Silva, S. C. V., Sartori, A. M., Bezerra, R. C., Westphalen, E. V. N., Molina, T. D., ... Shikanai-Yasuda, M. A. (2011). Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4⁺ Level. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(8),

De Marco, G., Iurrtia, M., Lapera, C., Lencina, A., Murgo, R., Sanguineri, V., Servieres, M., Suau, M., Venegas, M. (2005) Seroprevalencia de la enfermedad de chagas en pacientes que asistieron al tren sanitario”, 3ras Jornadas científicas del Comité de Docencia e Investigación, Hospital Prof, A. Posadas, Mención especial.

De Mulder, M., Holguín, A. (2013) Dried blood spots for monitoring HIV infection in public health programs in developing countries. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 31 (2),100 – 107

De Rissio, A., Scollo, K., & Cardoni, R.L. (2009). La transmisión madre-hijo del *Trypanosoma cruzi* en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 69(5), 529-535.

De Rissio, A., Riarte, A., García, M., Esteva, M., Quaglino, M., Ruiz, A. (2010) 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* : 82: 838–845.

Del Puerto, F., Sanchez, Z., Nara, E., Meza, G., Paredes, B., Ferreira, E., Russomando, G., (2010). *Trypanosoma cruzi* lineages detected in congenitally infected infants and *Triatoma infestans* from the same disease-endemic region under entomologic surveillance in Paraguay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 82, 386–390

De Rissio AM, Scollo K, Cardoni RL (2009) Maternal-fetal transmission of *Trypanosoma cruzi* in Argentina. *Medicina (B Aires)* 69: 529–535

Devera, R., Fernandes, O., Coura, J.R.(2003)Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex?A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection.Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98, 1–12.

Diez, M., Favaloro, L., Bertolotti, A., Burgos, J. M., Vigliano, C., Lastra, M.

P., Levin, M. J., Arnedo, A., Nagel, C., Schijman, A. G. and Favaloro, R. R. (2007), Usefulness of PCR Strategies For Early Diagnosis of Chagas' Disease Reactivation and Treatment Follow-Up in Heart Transplantation. *American Journal of Transplantation*, 7: 1633–1640.

Diosque, P., Barnabé, C., Padilla, A.M., Marco, J.D., Cardozo, R.M., Cimino, R.O., *et al.*, (2003) Multilocus enzyme electrophoresis analysis of *Trypanosoma cruzi* isolates from a geographically restricted endemic area for Chagas' disease in Argentina. *Int. J. Parasitol.* 33, 997–1003.

Duffy, T., Cura, C., Ramirez, J., Abate, T., Cayo, N., Parrado, R., *et al.* (2013) Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl Trop Dis* 7(1)

Elliott, I., Dittrich, S., Paris, D., Sengduanphachanh, A., Phoumin, P., & Newton, P. N. (2013). The use of dried cerebrospinal fluid filter paper spots as a substrate for PCR diagnosis of the aetiology of bacterial meningitis in the Lao PDR. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(10), E466–E472.

Ferrer, E., Lares, M., Viettri, M., Medina, M. (2013). Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.

Freilij, H., Altchek, J.(1995) Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis*.21:551–5. 10.1093

Freilij, H., Muller, L., González Cappa, S. (1983) Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas disease. *J Clin Microbiol* 1983; 18: 327-330

Gómez, P., Uribe, S. (2007). Preservación y almacenamiento de ADN de mariposas utilizando papel filtro. *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 191-196.

Gonzales, JL.;Jones, TW., Picozzi, K., Ribera Cuellar, H. (2003) Evaluation of a polymerase chain reaction assay for the diagnosis of bovine trypanosomiasis and epidemiological surveillance in Bolivia.*Kinetoplastid Biology and Disease*, 2003,2:8

González-Tomé, M. I., Rivera, M., Camano, I., Norman, F., Flores-Chávez, M., Rodríguez-Gómez, L., ...& García-Burguillo, A. (2013). Recomendaciones para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de la embarazada y del niño con enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(8), 535-542.

Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación (2012). http://www.msal.gov.ar/chagas/images/stories/Equipos/Guia_Nacional_Chagas_version_27092012.pdf

Gürtler, R. E., Cecere, M. C., Lauricella, M. A., Cardinal, M V., Kitron, U., & Cohen, J. E. (2007). Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology*, 134(Pt 1), 69–82.

Guthrie, R., Susi, A. (1963). A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 32:338–343.

Herrera, L. (2010). Una revisión sobre reservorios de *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* (Chagas, 1909), agente etiológico de la Enfermedad de Chagas. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50(1), 3-15.

Holguín, A., Norman, F., Martín, L., Mateos, M., Chacón, J., López-Vélez, R., Pérez-Molina, J. (2013) Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol*. 20:1197–1202

Hollegaard, M., Grove, J., Grauholm, J., Kreiner-Moller, E., Bonnelykke, K., Norgaard, M., *et al.* (2011) Robustness of genome-wide scanning using archived dried blood spot samples as a DNA source. *BMC Genet*. 12:58

Hotez P., Molyneux D., Fenwick A., Kumaresan J., Sachs S., Sachs J., *et al.* (2007). Control of neglected tropical diseases. *N. Engl. J. Med*. 357 1018–1027.

Hsiang, M., Lin, M., Dokomajilar, C., Kemere, J., Pilcher, C. D., Dorsey, G., & Greenhouse, B. (2010). PCR-based pooling of dried blood spots for detection of malaria parasites: optimization and application to a cohort of Ugandan children. *Journal of clinical microbiology*, 48(10), 3539-3543.

Irurtia, M., Montenegro, G., Magdaleno, A., Peluffo, G., Di Bartolomeo, S. (2016) Utilidad de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de *Trypanosoma cruzi*. Póster Congreso SADI 2016-194

Johansson, PJ., Jonsson, M., Ahlfors, K., Ivarsson, SA., Svanberg, L., Guthenberg, C. (1997) Retrospective diagnostics of congenital cytomegalovirus infection performed by polymerase chain reaction in blood stored on filter paper. *Scand. J. Infect. Dis*. 29:465–468

Katakura, K., Lubinga, C., Chitambo, H., & Tada, Y. (1997). Detection of *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* subspecies in cattle in Zambia by polymerase chain reaction from blood collected on a filter paper. *Parasitology research*, 83(3), 241-245

Kirchhoff, L. (2003) Advances in the Diagnosis of Chagas Disease Using Methods Based on Molecular Biology: PCR. *Enfermedad de Chagas- Chagas' Disease*. Disponible en <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/c317/kirch.PDF>

Kransdorf, E., Zakowski, P., Kobashigawa, J. (2014) Chagas disease in solid organ and heart transplantation. *Curr Opin Infect Dis* ; 27: 418–424.

Kun, H., Moore, A., Mascola, L., Stevner, F., Lawrence, G., Kubak, B., *et al.* (2009) Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. *Clin Infect Dis.*;48:1534–40.

Lages-Silva, E., Ramirez, L.E., Pedrosa, A.L., Crema, E., Cunha Galvão, L.M., Pena, S.D.J., *et al.* (2006). Variability of kinetoplast DNA gene signatures of *Trypanosoma cruzi* II strains from patients with different clinical forms of Chagas' disease in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2167–2171

Landis, J., Koch, G. (1977) The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*; 33: 159-74.

Lewensohn-Fuchs, I., Osterwall, P., Forsgren, M., & Malm, G. (2003) Detection of herpes simplex virus DNA in dried blood spots making a retrospective diagnosis possible. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 26(1), 39

López, A., Quan, J., Mejía, R., Banegas, E., & Fontecha, G. (2011). Comparación de gota gruesa y PCR para la detección de infecciones maláricas en Honduras. *Revista Ciencia Y Tecnología*, 0(9), 68-81

Lucero, R., Brusés, B., Merino, D., Fernández, G., Crenna, E., Alonso, J. (2007) Enfermedad de Chagas congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes-Argentina. *EnfEmerg*;9(3):121-124

Machado-Coelho, G., Vitor, R., Chiari, C., Antunes, C. (1995) Validity of serology for American trypanosomiasis with eluates from filter paper. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90:59–64.

Mackay, I. (2004) Real-time PCR in the microbiology laboratory *Clinical Microbiology and Infection* , Volume 10 , Issue 3 , 190 - 212

Manual de procedimientos del “Programa Nacional de Fortalecimiento de la Detección Precoz de Enfermedades Congénitas”, pesquisa endócrino metabólicas, ministerio de Salud de la Nación agosto (2011)

Marangoni, A., Capretti, MG., De Angelis, M., Nardini, P., Compri, M., Foschi, C., ... Cevenini, R. (2014). Evaluation of a New Protocol for Retrospective Diagnosis of Congenital Toxoplasmosis by Use of Guthrie Cards. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(8), 2963–2970.

Márquez, E., Crespo, M., Mir, M., Pérez-Sáez, M., Quintana, S., Barbosa, F., Pascual, J. (2013) Enfermedad de Chagas y donación renal. *Nefrología. Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología*. 33(1):128-33

Mora, M., Sanchez Negrette, O., Marco, D., Barrio, A., Ciaccio, M., Segura, M., et al. (2005) Early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection using PCR, hemoculture, and capillary concentration, as compared with delayed serology. *J Parasitol* 91: 1468–1473.

Morillo, CA., Marin-Neto, JA., Avezum A., Sosa-Estani, S., Rassi, A. Jr, Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, SJ, Yusuf S.(2015) BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. Oct;373(14):1295-306.

Moser, D., Kirchhoff, L., Donelson, J. (1989) Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27(7), 1477–1482.

Murcia, L, Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M., Segovia, M. (2013) Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*.31(Supl 1):26-34.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standards (2004) Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification: Approved Guideline. Wayne, Pennsylvania

Noireau, F., Diosque, P., & Jansen, A. M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Veterinary Research*, 40(2), 26.

PAHO/WHO (2006) Organización Panamericana de la Salud. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo, Uruguay, Organización Panamericana de la Salud. Washington DC: 1–28 [OPS/HDM/CD/425-06]

PAHO/WHO (2010) Enfermedad de Chagas: control y eliminación. Informe de la Secretaría. 63.ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD A63/17 Punto 11.14 del orden del día provisional 22 de abril de 2010 Disponible en http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=15376&Itemid=

PAHO/WHO (2014) Datos clave de las enfermedades infecciosas desatendidas Chagas. Organización Panamericana de la Salud OPS/OMS, marzo 2014, disponible en http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=24718&Itemid=

Peltola, H., Roine, I., Leinonen, M., Kuisma, L., Mata, A., Arbo, A., Goyo, J., and Saukkoriipi, A. (2010) "Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b meningitis by identifying DNA from cerebrospinal fluid-impregnated filter paper strips." *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 29, no. 2, pp. 111–114, 2010

Pinto, CM, Kalko, EK, Cottontail, I, Wellinghausen, N, Cottontail, VM. (2012) TcBat a bat-exclusive lineage of *Trypanosoma cruzi* in the Panama Canal Zone, with comments on its classification and the use of the 18S rRNA gene for lineage identification. *Infect Genet Evol.*:12:1328–32

Pinto Dias, J. (1995) História natural da doença de Chagas. *Arq Bras Cardiol.*65(4):359–66.

Piron, M., Fisa, R., Casamitjana, N., López-Chejade, P., Puig, L., Vergés, M., Gascón, J., Gómez i Prat, J., Portús, M., Sauleda S. (2007) Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103:195–200.

Plan Nacional de Sangre, Ministerio de Salud de la Nación. Disponible en http://www.msal.gob.ar/disahe/index.php?option=com_content&view=article&id=317&Itemid=58

Porrás, A., Yadon, Z., Altcheh, J., Britto, C., Chaves, G., Flevaud, L., *et al.* (2015) Target Product Profile (TPP) for Chagas Disease Point-of-Care Diagnosis and Assessment of Response to Treatment. *PLoS Negl Trop Dis* 9(6)

Portela-Lindoso, A., Bulcão, & Shikanai-Yasuda, M. (2003). Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. *Revista de Saúde Pública*, 37(1), 107-115

Programa Nacional de Chagas. Ministerio de Salud de la Nación El Chagas en el país y América Latina. Disponible en <http://www.msal.gob.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/el-chagas-en-el-pais-y-america-latina>

Guía para el control vectorial de la enfermedad de chagas. Programa Nacional de Chagas http://www.msal.gob.ar/chagas/images/stories/Equipos/guia_vectorial.pdf

Qvarnstrom, Y., Schijman, AG., Veron, V., Aznar, C., Steurer, F., *et al.* (2012) Sensitive and Specific Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Clinical Specimens Using a Multi-Target Real-Time PCR Approach. *PLoS Negl Trop Dis* 6(7): e1689

Ramírez, J. C., Cura, C. I., Moreira, O. da C., Lages-Silva, E., Juiz, N., Velázquez, E., ...Schijman, A. G. (2015). Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods

for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 17(5), 605–615.

Rahmah, N., Nurulhasanah, O., Norhayati, S., Zulkarnain, I., & Norizan, M. (2010). *Comparison of conventional versus real-time PCR detection of Brugia malayi DNA from dried blood spots from school children in a low endemic area.* *Tropical Biomedicine*, 27(1), 54-59

Rodríguez, I., De Abreu, N., Carrasquel, A., Bolívar, J., González, M., Scorza, J., & Pérez, H. (2010) Infecciones maláricas en individuos asintomáticos en la población indígena Jivi, Amazonas, Venezuela. *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 50(2), 197-218.

Roellig, D., Brown, E., Barnabe, C., Tibayrenc, M., Steurer, F., Yabsley, M. (2008) Molecular typing of *Trypanosoma cruzi* isolates, United States. *Emerg Infect Dis* 14, 1123-1125.

Salazar, P., Rojas, G., Bucio, M., Cabrera, M., García, G., Ruiz, A., Guevara, Y., & Tapia, R. (2007) Seroprevalencia de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* y su asociación con factores de riesgo en menores de 18 años de Veracruz, México. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 22 (2), 75-82.

Saleme, A., Yanicelli, Gl., Inigo, LA. *et al.* (1971) Enfermedad de Chagas-Mazza congénita en Tucuman. *Arch Argent Pediatr*. 69:162-69

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. New York. Cold Spring Harbor.; 9.14-9.19.

Sánchez, AG., Alvarellós, E., Kohout, I., Rodríguez Schulz, D., Enrique, C., Caeiro, JP., Alvarellós, T., (2016) Detection of *Trypanosoma cruzi* and Treatment Monitoring by PCR from Dried Blood Spot Samples in Children. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas*. 73(3):176-180

Scapellato, P., Bottaro, E., Scapellato, J., & Vidal, G. (2006). ¿Es posible la transmisión de la enfermedad de Chagas mediante el hábito de compartir jeringas entre pacientes HIV + adictos a drogas? *Medicina (Buenos Aires)*, 66(6), 595-596.

Schijman, AG., Bisio, M., Orellana, L., Sued, M., Duffy, T., Mejia Jaramillo, A., Cura, C., *et al.* (2011) International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 5(1) e931

Schijman, AG. (2014) Estrategias de amplificación génica para el diagnóstico y seguimiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas: Estado del Arte. En Rodríguez L., L G.(Coord general), Ponte-Sucre, A. (Coord. Temática) *Las TIC en el combate de las enfermedades desatendidas* (pp. 55-75) Fund. Telefónica. Edit. Ariel. Barcelona, España

- Smit, P., Elliott, I., Peeling, R., Mabey, D., & Newton, P. (2014) An Overview of the Clinical Use of Filter Paper in the Diagnosis of Tropical Diseases. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 90(2), 195–210.
- Sosa Estani, S., Segura, E. (1999) Tratamiento de la infección por *T. cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización en la Argentina. *Medicina (Buenos aires)*; 59: 166-70.
- Sosa Estani, S., Segura, E., Ruiz, A., Velázquez, E., Porcel, B., Yampotis, C. (1998) Chemotherapy with benznidazole in children in undetermined phase of Chagas Disease. *Am J Trop Med Hyg* ; 59: 526-9.
- Spillmann, C., Burrone, S., Coto, H. (2013) Sala de situación. Análisis de la situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Argentina: avances en el control, 2012. *Rev Argent Salud Pública*. Vol. 4 - Nº 15.
- Steyn, S. (2010) Evaluating the Sensitivity and Specificity of Dried Blood Spots by Real Time PCR for the Common Protein Gene, *lytA*, of *Streptococcus pneumoniae* in Diagnosing Pneumococcal Disease. Thesis (B.S., Emory University)
- Strout, R. (1963) A method for concentrating hemoflagellates. *The Journal of Parasitology*, vol. 48, article 100, 1962.
- Sturm, N., Degraeve, W., Morel, C., Simpson L. (1989) Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol.*;33: 205–214.
- Sturm, N.R., Campbell, D.A. (2010) Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 115, 35–43.
- Tajebe, A., Magoma, G., Aemero, M., & Kimani, F. (2014). Detection of mixed infection level of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* by SYBR Green I-based real-time PCR in North Gondar, north-west Ethiopia. *Malaria Journal*, 13, 411.
- Taller: transferencia de estrategias moleculares basadas en PCR para el diagnóstico de la infección congénita por *Trypanosoma cruzi* en el sistema sanitario público nacional. (2015) Instituto Nacional de Parasitología. Dr. Mario Fatała Chabén
- Tani, H., Tada, Y., Sasai, K., & Baba, E. (2008). Improvement of DNA extraction method for dried blood spots and comparison of four PCR methods for detection of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) infection in canine blood samples. *The Journal of veterinary medical science/the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(5), 461.
- Torrico, MC, Solano, M, Guzmán, JM, Parrado, R, Suárez, E, Alonzo-Vega, C, *et al.* (2005) Estimation of the parasitemia in *Trypanosoma cruzi* human infection: high parasitemias are associated with severe and fatal congenital Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop.*;38 Suppl 2:58-61.

Toso, A., Vial, F., Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, 139(2), 258-266.

Uttayamakul, S., Likanonsakul, S., Sunthornkachit, R., Kuntiranont, K., Louisirirochanakul, S., Chaovavanich, A., Sutthent, R. (2005) Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. *Journal of virological methods*, 128(1), 128-134.

Viana, G., Barbosa, D., Carmo, E., Peres, J., Nascimento, J. & Póvoa, M. (2010). Comparación entre dos métodos de obtención de DNA a ser usados como protocolos alternativos para la detección de parásitos humanos causadores de malaria por nested PCR. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(2), 49-54.

Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Bertocchi, G., Petti, M., Alvarez, MG., Postan, M., Armenti A. (2006) Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus notreatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. May 16;144(10):724-34).

Virreira M, Truyens C, Alonso-Vega C *et al.* (2007) Comparison of *Trypanosoma cruzi* lineages and levels of parasitic DNA in infected mothers and their newborns. *Am J Trop Med Hyg*; 77:102–6

Walter, T., Schweier, A., Wenzig, P. (2009) Isolation of DNA from Dried Blood Spot using “High Pure PCR Template Preparation Kit.” *Gene Expression*. BIOCHEMICA_4_09_p15-16

WHO, nota descriptiva Nro. 340, (2016) La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/>

WHO. Manual for HIV Drug Resistance Testing Using Dried Blood Spots Specimens (2010) http://www.who.int/hiv/topics/drugresistance/dbs_protocol.pdf

Wincker, P., Telleria, J., Bosseno, M., Cardoso, M., Marques, P., Yaksic, N., Aznar, C., Liegeard, P., Hontebeyrie, M., Noireau, F., Morel, C., Breniere, S. (1997) PCR-based diagnosis for Chagas disease in Bolivian children living in an active transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* 114 (Pt 4), 367-373

Workshop cucaiba, (2008) Disponible en <http://www.cucaiba.gba.gov.ar/viejo/Bibliografia%20Canuelas%202013/workshop%20cha%20version%2014%20de%20enero%202008.pdf>

Yeo, M., Acosta, N., Llewellyn, M., Sanchez, H., Adamson, S., Miles, G.A.J., *et al.*, (2005) Origins of Chagas disease: didelphis species are natural hosts of *Trypanosoma cruzi* I and armadillos hosts of *Trypanosoma cruzi* II, including hybrids. *Int. J. Parasitol.* 35, 225–233

Yoshioka, Kota, Tercero, Doribell, Pérez, Byron, & Lugo, Emperatriz. (2011). *Rhodnius prolixus* en Nicaragua: distribución geográfica, control y vigilancia entre 1998 y 2009. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 30(5), 439-444.

Zingales, B., Andrade, S., Briones, M., Campbell, D., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A., Machado, C., Miles, M., Romanha, A., Sturm, N., Tibayrenc, M., Schijman, A.(2009) A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104, 1051-1054.

Zingales, B., Miles, MA., Campbell, DA., Tibayrenc, M., Macedo, AM., Teixeira, MMG., *et al.* (2012) The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* ;12:240–253.