





Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma de Barcelona

Facultat de Ciències

Departament de Genètica i de Microbiologia

Programa de Doctorat en Microbiologia

**Enfermedad de Chagas crónica:
estrategias de mejora del diagnóstico molecular
y
alternativas al cribado serológico convencional**

Tesis Doctoral

Presentada por:

Aroa Silgado Giménez

Para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall
d'Hebrón bajo la dirección de:

Dra. Elena Sulleiro Igual

y

Dra. Núria Serre Delcor

Con la tutoria de:

Dra. M^a Rosa Bartolomé Comas

Barcelona, 2022

Elena Sulleiro Igual, facultativa especialista del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y Profesora asociada a la Universidad Autónoma de Barcelona, **Núria Serre Delcor**, médica adjunta del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y **M^aRosa Bartolomé Comas**, facultativa especialista del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón y Profesora asociada a la Universidad Autónoma de Barcelona

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado “**Enfermedad de Chagas crónica: estrategias de mejora del diagnóstico molecular y alternativas al cribado serológico convencional**”, presentado por Aroa Silgado Giménez, Graduada en Biología y Máster en Microbiología, ha sido realizado en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebrón bajo su dirección y cumple las condiciones exigidas por la normativa vigente para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral por compendio de publicaciones ante el tribunal que corresponda.

Directoras de Tesis Doctoral:

Tutora:

Dra. Elena Sulleiro Igual

Dra. Núria Serre Delcor

Dra. M^aRosa Bartolomé Comas

A mi abuela Isabel,

por cuidar mi infancia.

AGRADECIMIENTOS

Cuando llega el momento de escribir estas líneas te das cuenta de todas las personas con las que has compartido tiempo y vivencias y que, sin duda, tienen un buen peso en esta tesis.

Vull començar per les meves directores. Núria. Gràcies per acceptar la proposta sense gairebé coneixem. Gràcies per ser propera i la teva disponibilitat sempre que ho he necessitat. Elena. Primordial en el meu creixement professional i personal i en que hagi pogut realitzar aquesta tesi. Gràcies per la teva dedicació i paciència, per oferir-me la teva confiança i la oportunitat de treballar i aprendre tant al mateix temps.

Mateu. Estic molt agraïda que un dia m'acceptessis per a realitzar les pràctiques de la carrera. Gràcies per ensenyar-me a ser constant, a perseguir el que vull i a sempre donar el màxim. Francesc. Què seria dels meus coneixements en parasitologia sense tu! Gràcies per ensenyar-me tantes coses desconegudes, però sempre amb una il·lusió que contagia.

Al personal del Servicio de Microbiología e Infecciosas del Hospital Vall d'Hebrón con el que he tenido el placer de cruzarme por el camino. Agradecida de haber podido compartir y trabajar todo este tiempo con vosotros.

A Pili, Ana, Rodri por los maravillosos cafés de la tarde. Mi Mari. Qué suerte poder contar contigo dentro y fuera del trabajo. Tus achuchones son mis favoritos!! Gracias por ser ese rayo de luz cuando oscurece.

Candela. El meu *pin y pon*, la meva companya de gim, d'esmorzars i dinars, de tardes i sopars varis. Dels dies de compres, de LA crep, dels *minicrusants* de xoco, dels *dramas tesiles*, dels riures i d'alguna llagrimeta. Però sobretot la meva amiga, la del suport i els consells en el moment oportú. No tinc més que paraules d'agraïment per estar sempre, en tot moment. Infinitament agraïda per haver-me creuat amb tu ara fa gairebé 6 anys, però com si ens coneguéssim de tota la vida. Gràcies per ser d'aquelles persones que comptes amb una mà.

A los de siempre. Ylenia y Vane. Gracias por acompañarme en cada paso que he dado durante todos estos años. Gracias por darme ánimos y empujoncitos cuando más lo he necesitado. Gracias por todos los momentos buenos que hemos pasado juntas, pero aun más agradecida porque hayáis estado en los malos. A mis chicos del *vermouth*. Gracias por todo lo vivido y porque esta amistad siga al alza después de tantos años.

Natalia. Gracias por aparecer (y aguantar) aquel año en Madrid. Gracias por todos los recuerdos en Madrid, Asturias o Barcelona. Gracias por ser mi *amistad a distancia* favorita.

A mi familia. Papá y Mamá. Gracias por haberme ofrecido siempre lo mejor. Gracias por creer siempre en mí, por vuestro apoyo y orgullo incondicional. Adrià. Menos mal que llegaste! Que vida más aburrida sino sin nuestros momentos de karaoke, bailes o tonterías varias. No hay mejor regalo que teneros y saber que siempre estaréis conmigo. Gracias por ser la mejor familia que podría tener.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	1
ÍNDICE DE FIGURAS	2
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. RESEÑA HISTÓRICA	9
1.2. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	10
1.2.1. CICLO DE VIDA Y VÍAS DE TRANSMISIÓN	11
1.3. EPIDEMIOLOGÍA	15
1.3.1. EPIDEMIOLOGÍA MOLECULAR	17
1.3.2. PREVENCIÓN Y CONTROL	18
1.4. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS	22
1.4.1. FASE AGUDA	22
1.4.2. FASE CRÓNICA	23
1.5. DIAGNÓSTICO	25
1.5.1. PARASITOLÓGICO	25
1.5.2. MOLECULAR	26
1.5.3. SEROLÓGICO	29
1.6. TRATAMIENTO	31
2. JUSTIFICACIÓN	37
3. OBJETIVOS	41

4. RESULTADOS	45
4.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS	45
TRABAJO 1. COMPARACIÓN DE MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE ADN Y ENSAYOS DE PCR A TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA.	45
TRABAJO 2. EVALUACIÓN ANALÍTICA DE LA MUESTRA DE SANGRE SECA Y LA PRUEBA DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO COMO NUEVA ESTRATEGIA PARA EL CRIBADO SEROLÓGICO COMUNITARIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA.	55
4.2. TRABAJOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN	65
TRABAJO 3. UTILIDAD DE LAS RÉPLICAS DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA MEJORAR LA DETECCIÓN DE ADN DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EN MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA.	65
TRABAJO 4. CRIBADO COMUNITARIO OPORTUNISTA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS CRÓNICA MEDIANTE UNA PRUEBA DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO EN FARMACIAS DE BARCELONA (CATALUÑA, ESPAÑA): PROTOCOLO DE ESTUDIO Y RESULTADOS DE LA FASE PILOTO.	83
5. DISCUSIÓN	115
ESTRATEGIAS DE MEJORA DEL DIAGNÓSTICO MOLECULAR	115
ALTERNATIVAS AL CRIBADO SEROLÓGICO CONVENCIONAL	120
6. CONCLUSIONES	131
7. PERSPECTIVAS DE FUTURO	137
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	143
9. ANEXO	159

Lista de abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNk: ADN kinetoplasto

ADNsat: ADN satélite

BNZ: Benznidazol

CLIA: ensayo de quimioluminiscencia

COI: valor de corte

Ct: ciclo de amplificación

DBS: sangre seca

EC: enfermedad de Chagas

E-CLIA: ensayo de electroquimioluminiscencia

ELISA: ensayo inmunoenzimático

ETD: enfermedad tropical desatendida

EUA: Estados Unidos de América

GEB: guanidina-EDTA-sangre

IAC: control interno de amplificación

IC: intervalo de confianza

IFN: interferón

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

IPCA: Iniciativa de los Países de Centroamérica

IQR: rango intercuartil

Kb: kilobases

NFX: Nifurtimox

OMS: Organización Mundial de la Salud

pb: pares de bases

PBS: tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PDR: prueba de diagnóstico rápido

TNF: factor de necrosis tumoral

UDT: unidad discreta de tipificación

Índice de figuras

FIGURA 1. FORMAS BIOLÓGICAS DE <i>T. CRUZI</i> _____	12
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DE <i>T. CRUZI</i> (TRANSMISIÓN VECTORIAL) _____	14
FIGURA 3. NÚMERO ESTIMADO DE PERSONAS INFECTADAS CON <i>T. CRUZI</i> MUNDIALMENTE, SEGÚN DATOS DE LA OMS (2018) _____	16
FIGURA 4. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LAS DIFERENTES UDTs DE <i>T. CRUZI</i> EN EL CONTINENTE AMERICANO _____	17
FIGURA 5. ESQUEMA DE LAS DIFERENTES CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y MÉTODOS DE DETECCIÓN DE LAS FASES DE LA EC _____	24

RESUMEN

La fase crónica de la enfermedad de Chagas (EC) se caracteriza por una baja parasitemia y cursa de forma asintomática en la mayoría de los casos. Las técnicas moleculares basadas en la amplificación de ácidos nucleicos tienen un valor limitado para ser usadas como herramientas diagnósticas en esta fase. Uno de los protocolos más ampliamente utilizado para la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* consta de un método de extracción de ADN basado en columnas de sílice y una PCR a tiempo real para la amplificación de ADN satélite, diseñada hace más de diez años. Por otro lado, la ausencia de síntomas en esta fase, las barreras de acceso al sistema sanitario, así como el miedo y el estigma, hace que el diagnóstico temprano de la EC sea difícil y esté altamente infradiagnosticada. En este contexto, las intervenciones en la comunidad pueden favorecer el acceso a la población susceptible aumentando la cobertura del diagnóstico. Así, esta Tesis Doctoral tiene como objetivo principal evaluar alternativas en la metodología existente para la detección molecular y el cribado serológico de la infección crónica por *T. cruzi*.

Según los resultados obtenidos, la implementación de sistemas de extracción de ADN automatizados, así como la realización de tres réplicas de extracción y el uso de un nuevo conjunto de cebadores mejoran la detección de ADN de *T. cruzi* por PCR a tiempo real. Además, una estrategia de cribado serológico basada en la realización de una prueba rápida y, en los casos de resultado negativo, serología convencional mediante muestra de sangre en papel seco, alcanzó una sensibilidad del 97%. Se implementó una estrategia de cribado serológico oportunista para personas provenientes de área endémica a través de un programa realizado en las farmacias comunitarias de la ciudad de Barcelona.

ABSTRACT

The chronic phase of Chagas disease (CD) is characterized by low parasitemia and is asymptomatic in a majority of cases. Nucleic acid amplifications tests are of limited value for use as a diagnostic tool in this phase. One of the most widely used protocols for molecular detection of *T. cruzi* consists of a DNA extraction method based on silica columns and a real-time PCR for satellite DNA amplification, designed more than ten years ago. On the other hand, the absence of symptoms at this stage, in addition to barriers to access to the healthcare system, as well as fear and stigma, makes early diagnosis of CD difficult and highly underdiagnosed. In this context, community interventions can reach the susceptible population, increasing the diagnostic coverage. Thus, the main objective of this Doctoral dissertation is to evaluate alternatives in the existing methodology for molecular and serological screening of chronic *T. cruzi* infection.

According to the results obtained, the implementation of automated DNA extraction systems, as well as the performance of three extraction replicates and the use of a new set of primers improve the detection of *T. cruzi* DNA by real-time PCR. Moreover, a screening strategy based on performing a rapid test and, in cases of a negative result, serology using a blood sample on dry paper reached a sensitivity of 97%. An opportunistic serological screening strategy of people from endemic area was implemented through a program carried out in community pharmacies in the city of Barcelona.

1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) son un grupo diverso de afecciones infecciosas transmisibles que prevalecen en zonas tropicales, tienen un mayor impacto en las poblaciones más pobres y con un limitado acceso a los servicios de salud [1]. Afectan a más de 1 billón de personas [2], con una gran carga social, económica y sanitaria para quienes las padecen [3]. Actualmente, la lista de las ETD de la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye 20 patologías distintas, entre las cuales se encuentra la enfermedad de Chagas (EC) o tripanosomiasis americana [2].

La EC es una infección parasitaria causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. Es endémica en América Latina continental donde, a pesar de haber transcurrido más de un siglo desde su descubrimiento, sigue siendo un importante problema de salud pública [4]. Actualmente se reportan casos de EC en todo el mundo, principalmente debido a los movimientos migratorios desde los países latinoamericanos hacia regiones no endémicas [5].

1.1. RESEÑA HISTÓRICA

En 1908 el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934) se encontraba en el norte del estado brasileño Minas Gerais, concretamente en la población de Lassance, estudiando un brote de malaria que ocurría en la zona. Un trabajador ferroviario advirtió a Carlos Chagas de la presencia de un insecto hematófago, al que llamaban *barbeiro*, que picaba especialmente en la cara y por la noche. Chagas decidió diseccionar estos insectos, en el interior de los cuales encontró unos parásitos aún no descritos a los que llamó *Schyzotrupanum cruzi* (actualmente *Trypanosoma cruzi*) en honor a su mentor Oswaldo Cruz [6]. Un año más tarde, en

1909, Chagas visitó a una niña, Berenice, que cursaba con un cuadro febril, además de adeno-visceromegalias. Al analizar su sangre, Carlos Chagas observó los mismos parásitos que encontró al diseccionar a los *barbeiros*. Así, Chagas consiguió describir un nuevo agente infeccioso, su vector, hospedador y las manifestaciones clínicas de la enfermedad que llevaría su nombre [4]. Por ello estuvo nominado en dos ocasiones al Premio Nobel de Fisiología y Medicina (en 1913 y 1921), pero nunca le fue otorgado [7].

Sin duda, el descubrimiento de la EC está ligado a Carlos Chagas. No obstante, muchos investigadores contribuyeron a la descripción de distintos aspectos de la enfermedad. Especialmente, destacar la aportación del médico argentino Salvador Mazza (1886-1946) a la profundización del estudio de la EC en Argentina, describiendo la enfermedad en más de 1200 casos [8].

Más allá del descubrimiento por parte de Carlos Chagas en 1909, la infección por *T. cruzi* en humanos data de 9000 años atrás. Este hecho se encuentra corroborado por la detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) del parásito en tejido esquelético de momias encontradas en el norte de Chile y el sur de Perú [9].

1.2. *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi es un protozoo hemoflagelado perteneciente a la clase Kinetoplastea, orden Trypanosomatida, familia Trypanosomatidae y género *Trypanosoma* [10]. Al igual que el resto de los tripanosomátidos, *T. cruzi* tiene un orgánulo característico denominado kinetoplasto, una región localizada en la única mitocondria celular [11].

El ADN celular de *T. cruzi* está contenido en dos compartimentos: el kinetoplasto y el núcleo. El primero contiene ADN (ADNk) altamente compactado compuesto por una red de moléculas circulares concatenadas formada por docenas de maxicírculos (de

20-40 kilobases (Kb)) y miles de minicírculos (de 0.5-10 Kb) [12]. A su vez, los maxicírculos presentan dos regiones: una región codificante, altamente conservada, y una divergente, variable en longitud y con secuencias repetidas [13]. Los minicírculos están organizados en 4 regiones altamente conservadas de 120 pares de bases (pb) y 4 regiones hipervariables de 330 pb; ambos tipos de regiones se encuentran intercalados entre sí [14]. Por otro lado, el genoma nuclear de *T. cruzi* está formado en un 50% por secuencias de ADN repetidas [15], siendo el ADN satélite (ADNsat) de 195 pb el tipo de secuencia de ADN repetitivo más abundante del parásito [16], presente en aproximadamente 10^5 copias en el genoma [17].

T. cruzi es un microorganismo diploide [15] que se reproduce principalmente de forma asexual por fisión binaria, aunque existen evidencias de hibridación natural, eventos de intercambio genético y reproducción sexual [18,19]. También presenta una gran heterogeneidad genética, clasificándose actualmente en siete linajes o unidades discretas de tipificación (UDT), TcI-TcVI y Tcbat [20,21], que pueden ser diferenciadas mediante marcadores genéticos, moleculares o inmunológicos [22]. Esta amplia diversidad ha sido relacionada con el ciclo de transmisión, la distribución geográfica, la patogenia y algunas manifestaciones clínicas de la enfermedad, así como la respuesta al tratamiento tripanocida [23].

1.2.1. Ciclo de vida y vías de transmisión

La infección por *T. cruzi* es una zoonosis compleja en la que se ven involucrados un vector invertebrado y un hospedador mamífero [24]. Se encuentran implicadas más de 100 especies de insectos triatominos (orden Hemiptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae) y más de 70 géneros de hospedadores mamíferos, incluyendo especies silvestres (ciclo silvestre), animales domésticos y los humanos (ciclo doméstico y peridoméstico) [25].

Durante su ciclo de vida, *T. cruzi* sufre tres etapas de desarrollo bien definidas, en el hospedador y/o en el vector, que implican cambios genéticos, estructurales y metabólicos (**Figura 1**): (i) el amastigote, localizado en el interior de las células nucleadas del hospedador vertebrado, se divide por fisión binaria, tiene forma oval, no presenta flagelo y mide aproximadamente 4 μm de diámetro; (ii) el epimastigote, se encuentra en el intestino del vector invertebrado, también se divide por fisión binaria, es alargado, presenta flagelo, con el kinetoplasto situado anterior al núcleo y mide unos 20-40 μm ; y (iii) el tripomastigote, es la forma extracelular flagelada sin capacidad replicativa, también de forma alargada, con el kinetoplasto localizado de forma posterior al núcleo y mide unos 17 μm . Este último se encuentra tanto en el vector invertebrado como en el hospedador mamífero en forma de tripomastigote metacíclico o tripomastigote sanguíneo, respectivamente [26,27].

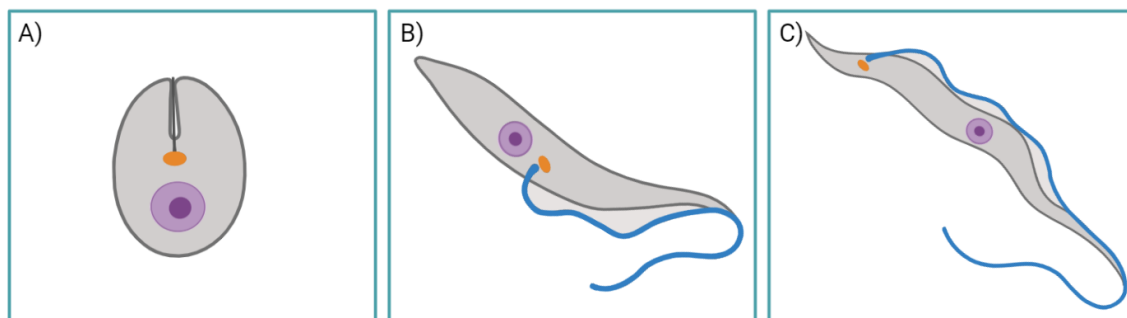


Figura 1. Formas biológicas de *T. cruzi*. A) Amastigote, B) Epimastigote, C) Tripomastigote. En lila, núcleo; en naranja, kinetoplasto; en azul, flagelo. Creado con BioRender.com.

En zona endémica, donde hay presencia del vector, la principal vía de transmisión es a través del insecto triatomino, conocido como “chinche”, “vinchuca”, “barbeiro”, “chinche besucona” (en inglés, *kissing-bug*), etc., según la región geográfica. Los géneros de triatominos más frecuentes implicados en la transmisión de *T. cruzi* son *Triatoma*, *Rhodinus* y *Panstrongylus* [27].

Cuando se alimenta de sangre, el triatomino infectado elimina una masa de excrementos (heces y orina) que deposita en la superficie de la piel del mamífero. Estas heces contienen tripomastigotes metacíclicos que, a través de erosiones en la piel o las mucosas, penetran en el organismo e invaden células nucleares locales. Aquí se diferenciarán en amastigotes, los cuales completarán varios ciclos de replicación hasta provocar la ruptura celular debido a la transformación a tripomastigotes sanguíneos. En este momento, los tripomastigotes pueden invadir otras células nucleares de tejidos adyacentes (especialmente músculo liso, esquelético y cardíaco), o entrar en el torrente sanguíneo o linfático y diseminarse así a tejidos lejanos. Cuando otro triatomino pica a un mamífero infectado con *T. cruzi*, ingiere tripomastigotes circulantes, los cuales se transformarán primero en epimastigotes en el tracto digestivo del vector y posteriormente en tripomastigotes metacíclicos que serán eliminados por las heces [27,28] (**Figura 2**).

En zona endémica también existe la posibilidad de transmisión oral tras la ingestión de comida o bebidas contaminadas con las heces del triatomino [29]. La infección también puede producirse mediante la transmisión de madre a hijo (vertical), las transfusiones sanguíneas, el trasplante de órganos y los accidentes de laboratorio, siendo las únicas vías posibles en áreas no endémicas, donde no existe la transmisión vectorial ni oral [27,30].

La transmisión congénita depende de las interacciones entre *T. cruzi*, la placenta, el sistema inmunitario materno y la respuesta inmunitaria fetal/neonatal en desarrollo [31]. Aunque la infección congénita por *T. cruzi* puede ocurrir en cualquier momento de la gestación [32], se ha observado que un factor de riesgo es la detección de una alta carga parasitaria durante el tercer trimestre de gestación [33].

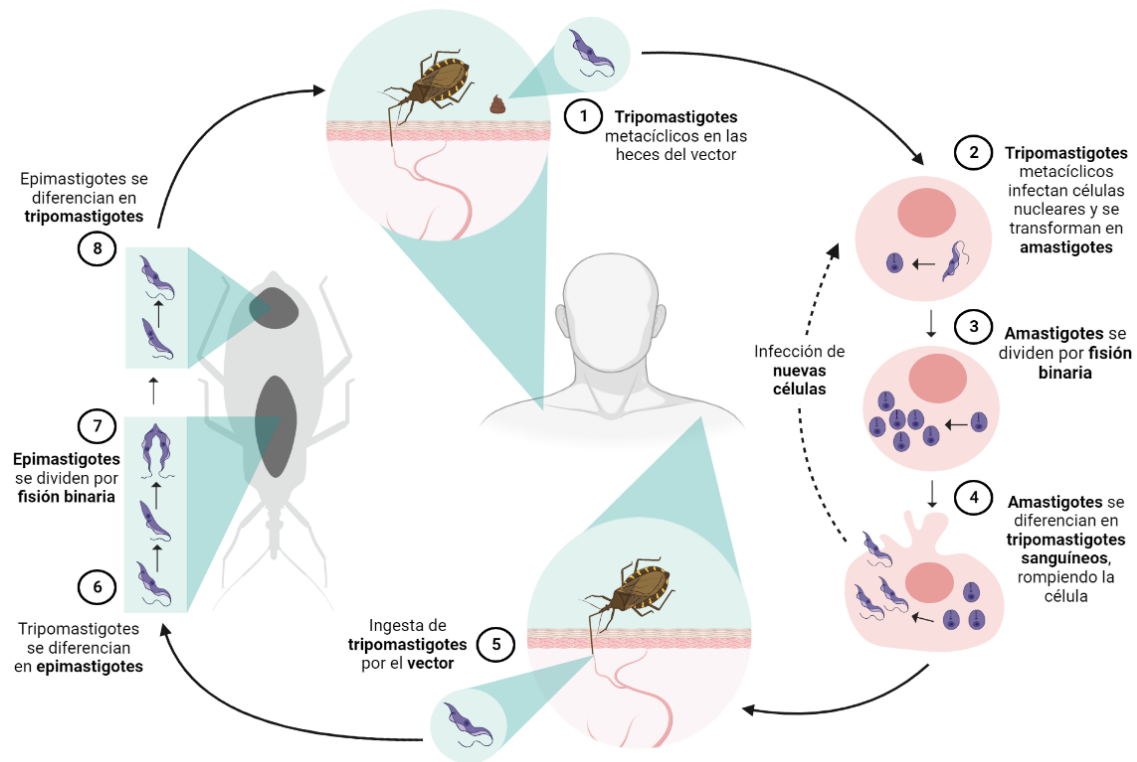


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi* (transmisión vectorial). 1) Los tripomastigotes metacíclicos son excretados por las heces y entran en el organismo a través de lesiones en la piel o mucosas; 2) Los tripomastigotes metacíclicos infectan células nucleadas próximas al lugar de entrada, dentro de las cuales se transforman en amastigotes; 3) Los amastigotes se dividen dentro de la célula por fisión binaria; 4) Los amastigotes se diferencian en tripomastigotes, con la consecuente rotura celular y su liberación al torrente sanguíneo o linfático; 5) El triatómino ingiere tripomastigotes al alimentarse de sangre infectada; 6) los tripomastigotes ingeridos se diferencian en epimastigotes en el tracto digestivo del vector; 7) los epimastigotes se replican por fisión binaria en el intestino del triatómino; 8) los epimastigotes se diferencian en tripomastigotes metacíclicos en el intestino posterior del vector. Adaptado de [27]. Creado con BioRender.com.

La transmisión de *T. cruzi* por transfusión de hemoderivados depende de diversos factores, como la concentración de parásitos en el inóculo, el estado inmunológico del receptor o la cantidad y tipo de componente sanguíneo transfundido [34]. Con respecto a esto último, se ha observado que los concentrados de plaquetas son el tipo de hemoderivado con mayor riesgo de transmitir la infección [35].

Durante la etapa posterior al trasplante, existe un estado de inmunosupresión que se traduce en un alto riesgo de desarrollar infecciones, principalmente durante el primer año [36]. Así, la transmisión de *T. cruzi* a través de trasplante de órganos ocurre desde un donador seropositivo a un receptor seronegativo [37].

Aunque de forma infrecuente, la transmisión también puede ocurrir por accidentes de laboratorio [38]. El trabajar con parásitos viables de *T. cruzi* hace que deba tenerse especial cuidado al manipular materiales que contengan estos microorganismos [39].

1.3. EPIDEMIOLOGÍA

La EC es endémica en 21 países de Latinoamérica¹, siendo Bolivia, Argentina y Paraguay los países con mayor prevalencia (6%, 3,6% y 2,1%, respectivamente) [40]. Aunque durante años la EC estuvo restringida a zonas rurales de los países endémicos, los procesos de urbanización y los movimientos migratorios han cambiado la epidemiología de esta enfermedad. Hoy en día se detecta sobre todo en zonas urbanas de América Latina, además de comunicarse casos fuera del área endémica, como los Estados Unidos de América (EUA), Europa, Japón y Australia [30,41].

La incidencia de personas con infección por *T. cruzi* varía entre estas regiones, siendo EUA y España los países que mayor número de casos reportan fuera del área endémica [42]. Concretamente, en España se estima que más de 50.000 personas están infectadas con *T. cruzi*, siendo la mayoría originarios de Bolivia, Paraguay, Nicaragua, Honduras y El Salvador (18%, 5,5%, 4,6%, 4,2% y 3,7%, respectivamente) [43].

¹ Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guyana Francesa, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Uruguay y Venezuela [2].

Se calcula que mundialmente hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi* y alrededor de 70 millones de personas se encuentran en riesgo de infección [44] (**Figura 3**). Cerca de 12.000 muertes al año son causadas directamente por la EC, con un coste global estimado de 8.000 millones de dólares al año en pérdida de productividad y costes sanitarios [45].

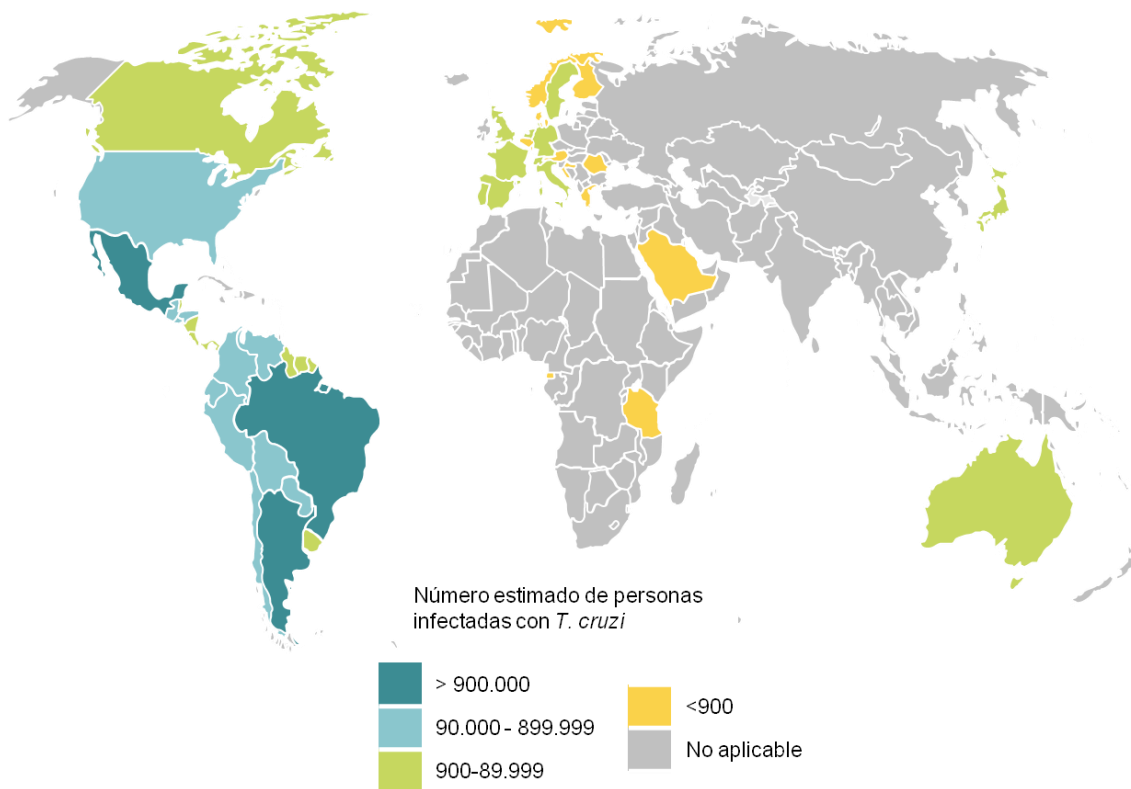


Figura 3. Número estimado de personas infectadas con *T. cruzi* mundialmente, según datos de la OMS (2018). Modificado de [46]. Creado con mapchart.net.

1.3.1. Epidemiología molecular

Las distintas UDTs se encuentran a lo largo de toda América Latina, aunque con una distribución diferente según la región geográfica (**Figura 4**).

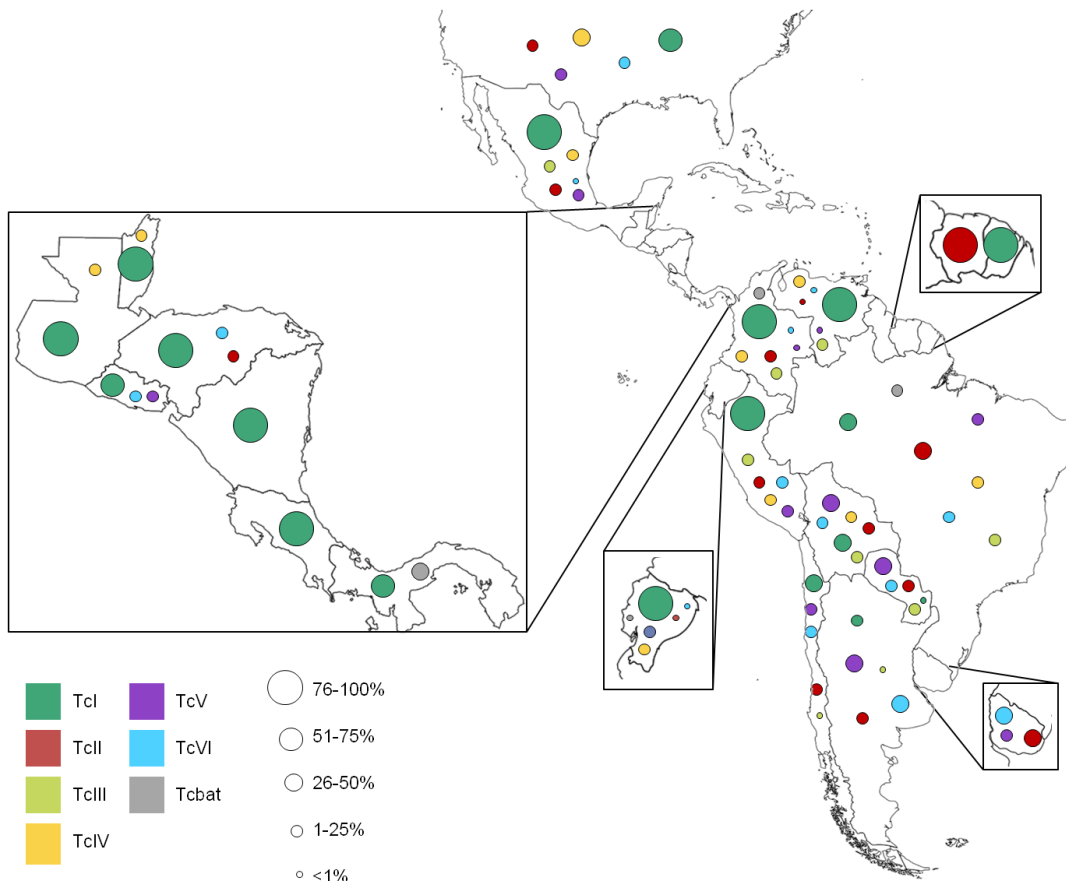


Figura 4. Distribución geográfica de las diferentes UDTs de *T. cruzi* en el continente americano. El tamaño de los círculos refleja el porcentaje que representa cada UDT respecto al total encontrado en cada país, según los datos disponibles en el trabajo de Velásquez-Ortiz, *et al.* de 2022 [47].

TcI es la UDT que se halla con mayor frecuencia y la que está ampliamente distribuida en todo el continente americano, con mayor representación en América Central y del Norte [48]. Las UDTs TcII, TcV y TcVI son más comunes en los países de América del Sur. Concretamente, TcII presenta una elevada prevalencia en Brasil, TcV en Bolivia y Paraguay y TcVI se encuentra mayoritariamente en Argentina [42,48].

Por otro lado, TcIII y TcIV son las UDTs con menor representación en el continente americano: TcIII es prevalente en Paraguay, mientras que TcIV es frecuente en Venezuela [42]. Respecto a la UDT identificada recientemente, Tcbat, ha sido detectada de forma puntual en Colombia, Brasil, Panamá y Ecuador [47].

En España, la UDT encontrada con mayor frecuencia es TcV, aunque también se han encontrado casos de infección por las UDTs TcIV, TcVI, TcII y TcI [49–52].

1.3.2. Prevención y control

Como una de las ETD definidas por la OMS, la EC está incluida en la hoja de ruta para la prevención, control, eliminación o erradicación de este tipo de enfermedades. En concreto, el objetivo para 2030 planteado para el control de la EC, a llevar a cabo tanto en países endémicos como no endémicos, es la interrupción de las cuatro vías principales de transmisión (vectorial, transfusión de sangre, trasplante de órganos y vertical) [2]. En las últimas décadas se han llevado a cabo diversas iniciativas a nivel mundial que han permitido reducir la incidencia de la EC [41].

El control de la transmisión vectorial ha sido el método más eficaz de prevención de la EC en América Latina [44]. A partir de la década de 1990, los países endémicos crearon planes intergubernamentales para mejorar la prevención, el control y la atención de la EC en estos países [53]. La iniciativa del Cono Sur (INCOSUR)¹ fue la primera iniciativa en crearse en 1991. Más tarde, se fueron estableciendo otras iniciativas con el mismo propósito: la iniciativa de los Países de Centroamérica (IPCA)² en 1997, la iniciativa de los Países Andinos (IPA)³ en 1998 y la iniciativa de los Países

¹ Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú

² Belice, Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua y Panamá

³ Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela

Amazónicos (AMCHA)¹ en 2004. México, que desarrolló una iniciativa de ámbito nacional en 2003 [53], se incorporó a la IPCA en 2013 [54]. Aunque los programas y planes de estas iniciativas están adaptados según el país y área de acción, en general se basan en la desinfección de las viviendas, el cribado y detección de la infección por *T. cruzi* en los bancos de sangre, así como la implementación de acciones dirigidas a reducir la morbilidad y mortalidad mediante una atención médica y tratamiento oportuno [54]. La aplicación de estas iniciativas ha contribuido a la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* en Chile, Guatemala y Uruguay, así como en ciertos territorios de Argentina, Brasil, El Salvador, Honduras, Paraguay, Perú y México [55].

La transmisión congénita ocurre en un 5% de los embarazos en América Latina, siendo este porcentaje algo menor en zonas no endémicas (alrededor del 2,7%) [56]. En España, diferentes estudios han reportado porcentajes de infección congénita de entre un 1-7% [57–61]. En cuanto a su control, no existe en Europa ningún tipo de legislación ni recomendación común acerca del cribado de la mujer embarazada que provenga de zona endémica [62]. En España, concretamente en Cataluña, Valencia, Galicia, y en la región de la Toscana en Italia, sí que hay disponible un protocolo sobre el cribado serológico para la detección de la infección por *T. cruzi* durante el embarazo, así como el seguimiento de los recién nacidos de madres infectadas [63–66]. Recientemente, ha sido aprobada la iniciativa ‘Ningún bebé con Chagas’ que tiene por objetivo contribuir a la eliminación de la transmisión vertical, que cuenta con la participación de Argentina, Brasil, Colombia y España [67].

¹ Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Guayana francesa, Guyana, Perú, Suriname y Venezuela

Otro punto de mejora importante en el control de la EC se debe a la intensificación de las acciones de cribado de la infección establecidas en los bancos de sangre. Actualmente, los 21 países endémicos presentan una cobertura de casi el 100% en el cribado de donantes de sangre [68]. La probabilidad de adquirir la EC tras la transfusión de una unidad de sangre de un donante infectado se encuentra entre el 10-20% [69]. La mayoría de países europeos disponen de legislación nacional para el cribado de la infección por *T. cruzi* en donantes de riesgo [62]. En España, el cribado pasó a ser obligatorio en 2005 (Real Decreto 1088/2005) y, atendiendo a los últimos datos disponibles, la prevalencia entre los donantes de sangre cribados para EC fue menor al 0,06% [70].

Respecto al control de la transmisión por trasplante de órganos, la mayoría de países europeos, incluido España, se rigen por recomendaciones tanto nacionales como internacionales [62,71]. El cribado de la infección por *T. cruzi* se debe realizar tanto en el donante como en el receptor [72]. La transmisión por trasplante de órganos no ocurre en todos los casos, ya que el riesgo depende del órgano trasplantado en cuestión, siendo las tasas de infección mayores en el caso del corazón (0,75-1), seguido del hígado (0-0,29) y el riñón (0-0,19) [73,74]. Así, el trasplante de órganos de donantes con infección aguda por *T. cruzi*, o el trasplante de corazón e intestino de donantes con infección crónica está contraindicado, mientras que el trasplante de otros órganos, como el hígado o el riñón, está sujeto a valoración [71,75]. En el caso del receptor se recomienda una monitorización estrecha para detectar una posible reactivación (en receptores con infección previa) o infección aguda (en receptores seronegativos) [76].

A pesar de los hitos conseguidos en los últimos años, uno de los grandes obstáculos para el control y la prevención de la EC es la elevada proporción de casos sin diagnosticar. Globalmente, se calcula que un 90% de las personas infectadas con *T. cruzi* no lo saben [77]; recientemente en España este porcentaje ha sido estimado en un 70% [78].

Fuera del área endémica, el infradiagnóstico de las personas infectadas por *T. cruzi* responde a una compleja matriz de factores interrelacionados, atribuidos principalmente al desconocimiento de la enfermedad (generalmente asintomática), a barreras psicosociales, como el miedo y el estigma entorno a la EC y a barreras administrativas, como la dificultad de acceso a los sistemas de salud [79]. Además, la población de riesgo y muchos profesionales sanitarios desconocen la EC y sus implicaciones [80,81]. Estos factores complican el acceso al diagnóstico y, en consecuencia, al tratamiento y al seguimiento clínico de la población de riesgo [82]. Por ende, y atendiendo a las diversas dimensiones que la EC abarca (políticas, económicas, biomédicas y sociales), es necesario que sea abordada de una forma multidimensional [83].

De esta manera, las actividades comunitarias forman parte de las estrategias de prevención que tienen como objetivo identificar y acceder a la población de riesgo para mitigar estas barreras psicoemocionales y socioantropológicas que presenta la EC [82,84].

En España, la EC está fuera del plan de control nacional y tampoco está considerada en el sistema nacional de vigilancia [85]. Sin embargo, se han realizado distintas intervenciones que han demostrado ser una herramienta útil para llegar a la población susceptible [82,86,87] y también para promover el conocimiento y concienciación sobre la EC [86].

Un ejemplo pionero de sensibilización y empoderamiento de las personas afectadas es el programa del paciente experto en Cataluña. Este tiene como objetivo formar a personas que han sido diagnosticadas de EC, brindándoles conocimiento e información técnica acerca de la enfermedad, para que puedan transmitirla de forma accesible a su comunidad [88]. Otras estrategias comunitarias llevadas a cabo han sido la realización de talleres en centros de salud, la asistencia a eventos (fiestas

nacionales, elecciones...) o la realización de cribados *in situ* a través de campañas. En un estudio donde se comparaban dichas actuaciones, se observó que el cribado *in situ* era la que mayor cobertura ofrecía [79]. Aun así, las estrategias de cribado deben ser aplicadas atendiendo a las necesidades y objetivos planteados.

1.4. PATOGENIA Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La EC tiene una presentación clínica y una progresión variables, donde ocurre una primera fase aguda seguida de una fase crónica si los pacientes no son tratados [27] (**Figura 5**).

1.4.1. Fase aguda

La fase aguda presenta un tiempo de incubación que varía de una a dos semanas, pudiendo durar hasta los dos meses, y se caracteriza por la presencia de un gran número de parásitos en sangre [89]. En la mayor parte de los casos se trata de una fase asintomática, aunque pueden ocurrir síntomas, en general leves, que incluyen fiebre, hepatoesplenomegalía y adenopatías. En algunas ocasiones puede aparecer inflamación en el sitio de inoculación del parásito a través del vector, denominado Chagoma si se produce a través de la piel, o Signo de Romaña si se produce a través de la mucosa ocular [27]. En un 1-5% de los casos estos síntomas pueden ser graves, como miocarditis o meningoencefalitis [69], siendo el riesgo de mortalidad en esta fase de un 0,2-0,5% [27].

Esta fase representa el primer contacto entre el parásito y el hospedador, momento en el que se desencadena la respuesta inmunológica [90]. Tanto la inmunidad innata como la adaptativa juegan un papel clave en el control de la replicación del parásito y su consecuente diseminación por el organismo [89], mediante el papel de distintas citoquinas (como Interleuquina (IL)-12, factor de necrosis tumoral (TNF)- α e Interferón (IFN)- γ) como a través de anticuerpos, linfocitos T CD8+ (citotóxicos) y CD4+ (colaboradores). La inmunidad protectora en la fase temprana de la enfermedad se asocia a una respuesta inflamatoria de tipo Th1 (h de *helper* en inglés) [89], donde la fagocitosis cumple un rol esencial para el control y destrucción del parásito [91].

Después de 2-3 meses se consigue un control del número de parásitos en sangre y en tejidos [92], lo que lleva al inicio de la fase crónica de la enfermedad.

1.4.2. Fase crónica

La fase crónica está caracterizada por una parasitemia baja e intermitente, pero con una elevada producción de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* de tipo inmunoglobulinas G (IgG) [93]. En esta fase, alrededor de un 60-70% de las personas infectadas con *T. cruzi* son asintomáticas, conocido como forma crónica indeterminada. El porcentaje restante desarrollará una forma clínica con afectaciones cardíacas, digestivas, o ambas, que pueden aparecer entre 10 y 30 años después de haber adquirido la infección [27].

La aparición, o no, de sintomatología en la fase crónica depende principalmente de la respuesta inmunológica que se produzca en el individuo [92]: la existencia de un balance entre citoquinas inflamatorias (como TNF- α e IFN- γ) y antiinflamatorias (como IL-10) supone una ausencia de manifestaciones clínicas en la fase crónica de la EC [89].

La forma crónica cardíaca es la más frecuente (se desarrolla en un 14-45% de los individuos) y la más severa, afectando principalmente al sistema conductor del corazón y produciendo alteraciones en el miocardio, que pueden desembocar en insuficiencia cardíaca [94]. La afectación digestiva se produce en un 10-20% de los sujetos, con la aparición de mega vísceras (megaesófago y megacolon) debido a lesiones del sistema nervioso entérico que resultan en dilataciones de estos órganos [95]. La presencia de ambas implicaciones, cardíacas y digestivas, se presenta en un bajo porcentaje de personas infectadas, alrededor del 5-20% [27].

En situaciones de inmunosupresión producidos durante la fase crónica, puede ocurrir una reactivación de la infección, pudiendo ocasionar un cuadro agudo y grave, como miocarditis, afectación del sistema nervioso central (meningoencefalitis o abscesos cerebrales) o lesiones cutáneas [96].

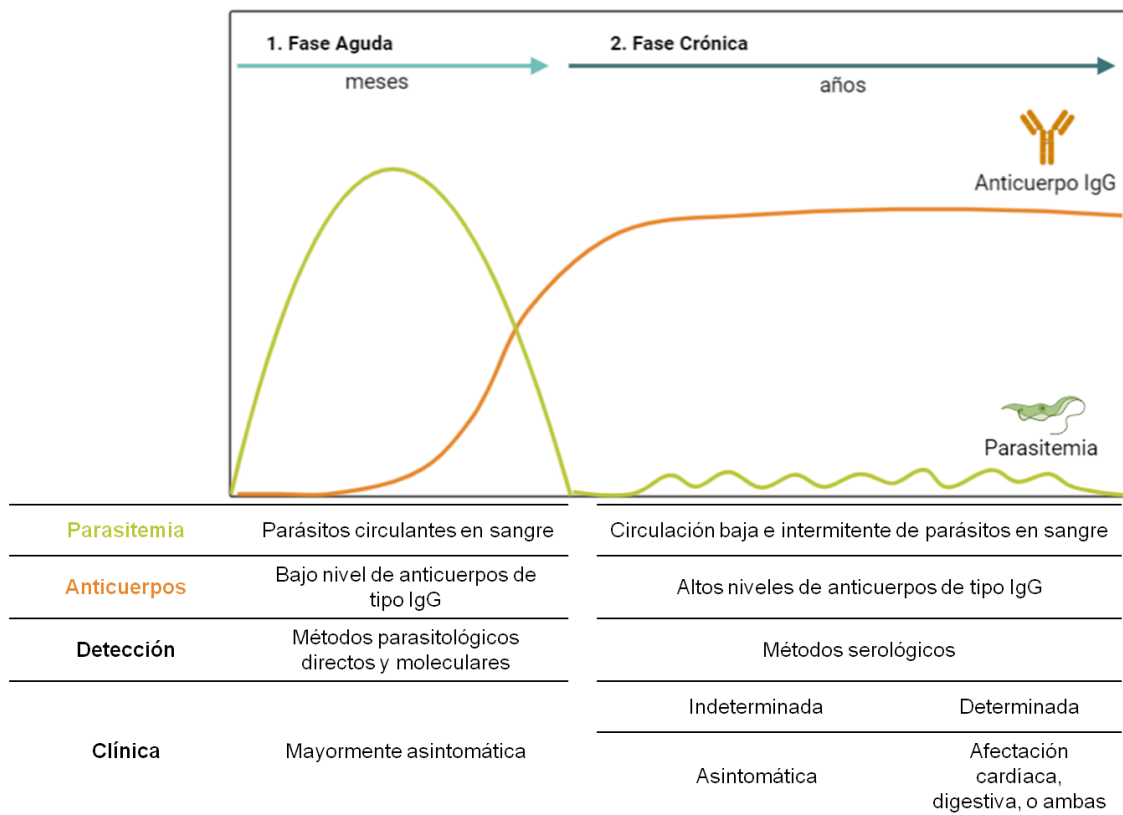


Figura 5. Esquema de las características clínicas y métodos de detección de las fases de la EC. Adaptado de [97,98]. Creado con Biorender.com.

1.5. DIAGNÓSTICO

La fase clínica de la EC determinará qué métodos de diagnóstico deben aplicarse. Por consecuente, si se trata de una infección aguda, caracterizada por una parasitemia elevada, las herramientas para la detección directa del parásito serán las más recomendadas (técnicas parasitológicas y moleculares). Por el contrario, en la fase crónica, donde la parasitemia es más baja, el diagnóstico se centrará en la detección de anticuerpos específicos contra *T. cruzi* (técnicas serológicas) [97] (**Figura 5**).

1.5.1. Parasitológico

Los métodos parasitológicos tienen como objetivo visualizar la presencia de *T. cruzi* mediante el examen microscópico.

Los parásitos circulantes en sangre periférica pueden detectarse por microscopía bien por observación de tripomastigotes en examen en fresco, o bien mediante gota gruesa y extensión teñidas con colorante (Giemsa), con valores de sensibilidad que varían entre el 34% y el 92% [97]. Con los métodos de concentración, como el método de Strout o el microhematocrito [99,100], se puede incrementar la sensibilidad, obteniendo porcentajes superiores al 95% [101].

Otras técnicas parasitológicas son el hemocultivo y el xenodiagnóstico, que permiten la proliferación de parásitos en cultivos *in vitro* o vectores, respectivamente [102]. Estas técnicas están cada vez más en desuso para el diagnóstico de la EC, quedando relegadas a laboratorios especializados en investigación [103].

1.5.2. Molecular

Las técnicas de amplificación molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*), permiten la detección de ADN de *T. cruzi* mediante cebadores que se unen a secuencias de ADN concretas.

Existen distintos ensayos basados en la PCR para la detección molecular de *T. cruzi*, especialmente útiles en situaciones de elevada parasitemia, ya que presentan una sensibilidad y especificidad mayor en comparación a los métodos parasitológicos tradicionales [104]. Se utiliza principalmente para el diagnóstico de la fase aguda, la detección temprana de la transmisión congénita [105,106], la reactivación en pacientes inmunosuprimidos y el seguimiento post-trasplante [107,108]. Por el contrario, en la fase crónica, debido a la baja parasitemia, la sensibilidad de la PCR disminuye de forma considerable, por lo que su uso como único método diagnóstico en pacientes con infección crónica no está recomendado. Aun así, puede emplearse como herramienta complementaria en casos donde la serología sea discordante [109].

Además de la carga parasitaria presente en la muestra, la sensibilidad de la PCR varía atendiendo a otros factores, como el volumen de sangre analizado, el método de extracción de ADN empleado o la diana escogida [110].

Con el fin de aumentar la sensibilidad de la técnica para su uso en la fase crónica, se ha propuesto la estrategia de analizar muestras seriadas para aumentar el volumen de muestra analizado y así la probabilidad de detectar ADN de *T. cruzi* [111,112].

La extracción de ácidos nucleicos es un paso importante para muchas aplicaciones de biología molecular, como la PCR. Para ello, es necesario que el material genético extraído esté libre de componentes que puedan inhibir las reacciones de PCR [113]. En el caso de la detección molecular de *T. cruzi*, la muestra de sangre para análisis moleculares debe ser tratada con clorhidrato de guanidina 6M-EDTA 0,2M pH8 (guanidina-EDTA-sangre; GEB). Este pre-tratamiento permite homogeneizar las muestras e inhibir las ADNasas, de manera que se conserve el ADN del parásito, aumentando así la eficacia de la extracción [97].

Existen diversos tipos de procedimientos para la extracción de ADN, desde los más convencionales, como el método del fenol-cloroformo, hasta los más actuales, como los basados en membranas de sílice, fibras de vidrio o partículas magnéticas [114]. La mayoría de estos sistemas actuales están disponibles en kits comerciales que facilitan el proceso de extracción del material genético de la muestra de interés [114].

Con el desarrollo de los sistemas automatizados de extracción (basados principalmente en partículas magnéticas) se ha conseguido una serie de ventajas respecto a los manuales (basados en matrices de sílice o fibras de vidrio), como la reducción en el tiempo de procesamiento, menor riesgo de contaminación, la posibilidad de analizar un mayor número de muestras de forma simultánea e incrementar la reproducibilidad de los resultados [114–116]. Aunque el sistema manual de extracción de ADN basado en columnas de sílice es ampliamente usado en estudios moleculares de *T. cruzi* [13,49,117–120], este método presenta importantes desventajas cuando deben analizarse un gran volumen de muestras [115,116]. De este modo, diversos ensayos clínicos sobre el tratamiento de la EC crónica han empleado sistemas automatizados con un mayor rendimiento para la extracción de ADN [121,122].

La metodología de detección molecular mejoró con el desarrollo de diferentes sistemas de PCR a tiempo real que, a diferencia de la PCR a tiempo final, permite la amplificación y la detección de la misma a medida que se produce. Adicionalmente, se permite la cuantificación de la carga parasitaria presente en la muestra [123,124].

Con respecto a las dianas para la detección de ADN de *T. cruzi*, las más utilizadas son el ADNk y el ADNsat [125]; ambas regiones están presentes en un número muy elevado de copias en el genoma del parásito, lo que permiten alcanzar una elevada sensibilidad y especificidad. En un estudio realizado por Ramírez *et al.* se determinó que la amplificación de ADNk mostraba una sensibilidad mayor respecto a la de ADNsat [126]. Existen múltiples parejas de cebadores, siendo la más ampliamente utilizada la descrita por Pirón *et al.* en 2007 para la amplificación de ADNsat por PCR a tiempo real [123]. Sin embargo, en 2017 se evaluó un nuevo set de cebadores que mostró una mejor sensibilidad [127].

Por otro lado, es importante que en la muestra eluida no haya presencia de sustancias inhibitorias, ya que esto podría causar la obtención de resultados de falsos negativos durante la amplificación del ADN. Con el fin de validar los resultados obtenidos, los protocolos de PCR a tiempo real permiten utilizar controles internos de amplificación (IAC, del inglés *internal control amplification*), que co-amplifican con la secuencia diana permitiendo detectar los falsos negativos debidos a la inhibición en la reacción de amplificación [124]. Algunos estudios incluyen como control interno un fragmento de ADN humano, como el gen de la Ribonucleasa P (RNAsa P) [123]. No obstante, el contenido de ADN humano puede ser muy variable entre muestras ya que depende del estado nutricional, metabólico e inmunológico del paciente [124]. Para ello, se ha validado el uso de un control interno extrínseco, como el plásmido lineal pZErO-2 recombinante que contiene una secuencia de una aquaporina de *Arabidopsis thaliana* [124].

A pesar de las ventajas que ofrece la reacción de la PCR en el diagnóstico molecular de la EC, en áreas donde los recursos son escasos, no pudiendo contar con la infraestructura y los equipos necesarios para llevarlas a cabo, otras herramientas moleculares serían adecuadas [128]. Así, la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP, del inglés *loop-mediated isothermal amplification*) necesita temperaturas más bajas para llevar a cabo la reacción que en el caso de la PCR, obteniendo resultados que pueden detectarse a simple vista en aproximadamente una hora [129,130].

1.5.3. Serológico

Las técnicas serológicas para el diagnóstico de la EC tienen como finalidad detectar anticuerpos IgG anti-*T. cruzi*. Estas técnicas usan como antígenos el parásito completo y extractos purificados (pruebas convencionales) o antígenos recombinantes y péptidos sintéticos (pruebas no convencionales).

Las pruebas convencionales más comunes son la inmunofluorescencia indirecta, la hemoaglutinación indirecta y los ensayos inmunoenzimáticos (ELISA, del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*). Recientemente, se ha comercializado un kit de diagnóstico en formato de quimioluminiscencia (CLIA, del inglés *chemiluminescence immunoassay*) basado en la detección de antígeno nativo. Las pruebas no convencionales pueden usarse también en formato CLIA, ELISA o en tiras de inmunocromatografía (prueba de diagnóstico rápido, PDR). Las técnicas convencionales presentan una mayor sensibilidad pero existe el inconveniente de encontrar reacciones cruzadas con otros tripanosomátidos, como *T. rangeli* o *Leishmania* spp. [131,132]. Por tanto, con las técnicas no convencionales se ha conseguido aumentar la especificidad de la detección serológica disminuyendo la reactividad cruzada.

Debido a la inexistencia actual de una prueba de referencia serológica que por sí sola alcance el 100% de sensibilidad y especificidad, el diagnóstico serológico debe basarse en el uso de dos test serológicos que empleen una tecnología y un tipo de antígeno distintos [133]. No obstante, el hecho de utilizar dos pruebas serológicas diferentes puede dar lugar a la obtención de resultados discordantes, por lo que en estos casos se debe realizar una tercera prueba para esclarecer el diagnóstico [133]. En el caso de la serología en formato CLIA usando antígenos recombinantes, su sensibilidad es tan elevada que se ha planteado su uso como única prueba de diagnóstico [134].

Por el contrario, las PDR no tienen una sensibilidad suficientemente elevada como para ser usadas en solitario en el diagnóstico serológico de la EC [135]. Aun así, son una buena alternativa en zonas donde el acceso al diagnóstico es limitado o para la realización de cribados a gran escala [136,137], ya que no requieren de una infraestructura para su análisis y permiten un resultado rápido (alrededor de los 10-15 minutos) [138]. Aunque un resultado positivo obtenido mediante una PDR debe confirmarse mediante métodos serológicos convencionales [135], diversos estudios han propuesto el uso de dos PDR distintas con resultado concordante para determinar el diagnóstico, particularmente en áreas de difícil acceso [136,139,140].

Si bien las muestras convencionales para serología son el suero o el plasma, también se ha planteado el uso de muestras de sangre seca en papel de filtro (DBS, del inglés *dried blood spot*) para realizar determinaciones serológicas [141]. En este tipo de muestra, los anticuerpos quedan retenidos en la superficie del papel de filtro de celulosa, el cual presenta poros de distinto tamaño según las partículas que quieran ser retenidas. Para poder realizar ensayos serológicos a partir de sangre seca, es necesario realizar un protocolo de elución para poder recuperar los anticuerpos adheridos en el papel, siendo el tampón salino fosfatado (PBS, del inglés *phosphate-buffered saline*) el más utilizado [142].

La muestra de DBS es fácil de recoger, de bajo coste y simplifica el transporte y almacenamiento de muestras sanguíneas [143], lo que la hace una alternativa práctica a las muestras convencionales, especialmente en zonas con escaso acceso a servicios de laboratorio, así como escenarios de cribado comunitario o estudios epidemiológicos a gran escala [144].

Ambas PDR y DBS pueden realizarse y obtenerse a partir de una punción en el dedo, lo que facilita la logística del procedimiento así como la predisposición del paciente a ser examinado [102].

1.6. TRATAMIENTO

Desde su desarrollo en los años 60-70s, los únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la EC son el Benznidazol (BNZ) y el Nifurtimox (NFX). Ambos fármacos requieren de largos periodos de tratamiento, presentan un amplio abanico de efectos secundarios y, aunque su eficacia es variable dependiendo de la fase de la EC en la que se administran, esta es mayor si se administran lo antes posible tras la infección [145]. No obstante, en general se prefiere el tratamiento con BNZ frente al de NFX por su mejor tolerabilidad, menor presencia de efectos secundarios y, posiblemente, mayor eficacia [27]. Debido a los efectos adversos, el tratamiento se interrumpe en un 9-29% de los casos para el BNZ [146,147], mientras que para el NFX este porcentaje es algo más elevado, entre el 14-75% [148].

En fase aguda se recomienda siempre el tratamiento, independientemente de la vía de transmisión, ya que mejora la sintomatología y elimina la parasitemia [133,149], alcanzando un porcentaje de curación de aproximadamente el 80% [150]. El tratamiento temprano en casos de inmunosupresión previene la progresión hacia una forma severa de EC [96] y, en los casos congénitos, el tratamiento durante el primer

año de vida permite alcanzar una curación del 100% [151,152]. Esto destaca la importancia de cribar a los recién nacidos de madres infectadas con *T. cruzi* lo antes posible, ya que retrasar el inicio del tratamiento puede disminuir la eficacia del mismo [151].

La eficacia del tratamiento, tanto de BNZ como de NFX, en la fase crónica de la EC disminuye según el paso del tiempo desde la infección primaria y sus valores son muy bajos cuando hay afectación orgánica [153]. En el caso de BNZ, los porcentajes de curación son más elevados si los pacientes son tratados en edades más tempranas (60-94% en menores de 13 años), mientras que en adultos son muy variables. En algunos estudios, la eficacia no llega al 40% [27], sin embargo, según nuestros datos, el porcentaje de fracaso de tratamiento encontrado es únicamente del 2% [154]. Respecto al NFX, en individuos menores de 14 años en fase crónica el porcentaje de curación está en un 86%, mientras que en adultos no llega al 10% [155]. A pesar de los diversos valores de eficacia, se ha demostrado que la transmisión de madre a hijo se reduce drásticamente en mujeres tratadas en edad fértil [156] y que en adultos con EC crónica indeterminada el tratamiento reduce la progresión hacia la forma sintomática [27].

En vista de que tanto BNZ como NFX están lejos de ser un tratamiento ideal para la EC, especialmente en fase crónica, es necesario el desarrollo e investigación de nuevos fármacos o pautas de tratamiento. Un ensayo clínico reciente para evaluar nuevos esquemas terapéuticos de BNZ es el estudio MULTIBENZ (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT03191162). Este es un ensayo clínico de fase II, aleatorio y multicéntrico a nivel internacional que tiene por objetivo evaluar la seguridad y eficacia de tres pautas de dosis distintas de BNZ para el tratamiento de la EC en fase crónica. Las pautas a comparar son una dosis baja (150mg/día durante 60 días) o una dosis corta (400mg/día durante 15 días) frente a la dosis estándar de BNZ (300 mg/día durante 60 días) [157].

La monitorización de la respuesta al tratamiento no está todavía bien definida. Actualmente, el único criterio de curación de la EC es la seroreversión, pero el nivel de anticuerpos en los pacientes crónicos se mantiene elevado durante muchos años, incluso después del tratamiento [158]. Esto supone un inconveniente en los ensayos clínicos que evalúan la eficacia de nuevos enfoques terapéuticos para la fase crónica de la EC [159]. En este contexto, la detección de ADN de *T. cruzi* en sangre periférica mediante PCR a tiempo real se ha utilizado como biomarcador indirecto de respuesta terapéutica en ensayos clínicos a corto plazo de la EC crónica [121,160–162]. Aunque la detección de ADN es una herramienta útil para la detección temprana del fracaso del tratamiento, no es útil para determinar curación, ya que un resultado negativo no indica la ausencia de infección [163].

2

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de haber transcurrido más de 100 años desde su descubrimiento, la EC requiere de medidas que ayuden a su control y que impliquen mejoras en el diagnóstico.

El uso de la PCR en la fase crónica presenta valores de sensibilidad variables entre protocolos, aunque todos ellos presentan un valor limitado para ser usados como herramienta diagnóstica. De esta manera, evaluar alternativas a los ensayos ya descritos que aumenten la capacidad de detección de ADN de *T. cruzi*, serán especialmente útiles en la detección de fracasos terapéuticos y en la evaluación de nuevos esquemas de tratamiento.

Por otro lado, la ausencia de síntomas en esta fase, las barreras de acceso al sistema sanitario, así como el miedo, el estigma y el desconocimiento por parte de los profesionales sanitarios, hace que la EC esté altamente infradiagnosticada. La dificultad de llegar a la población más susceptible implica que deben estudiarse alternativas al diagnóstico serológico convencional, en particular aquellas dirigidas al cribado en la comunidad que permitan aumentar la detección de casos, facilitando el acceso al tratamiento y el correcto manejo del paciente.

3

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Objetivo principal:

Evaluar alternativas en la metodología existente para la detección molecular y el cribado serológico de la infección crónica por *T. cruzi*.

Objetivos específicos:

- Evaluar la sensibilidad de la técnica de PCR a tiempo real al combinar dos sistemas de extracción de ADN y dos parejas de cebadores para la detección molecular de *T. cruzi*.
- Evaluar el rendimiento de un distinto número de réplicas de extracción de ADN en la mejora de la capacidad de detección de ADN de *T. cruzi* de la PCR en tiempo real en el contexto del ensayo clínico MULTIBENZ.
- Evaluar la utilidad de la muestra de DBS como alternativa a la muestra de suero para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* por medio de dos técnicas serológicas diferentes.
- Evaluar el uso de una PDR (*Trypanosoma Detect*[™]) para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi*.
- Proponer un algoritmo de cribado serológico de fácil implementación y alta sensibilidad para su aplicación a nivel comunitario.
- Describir el protocolo y los resultados de la fase piloto de un programa de cribado oportunista, utilizando una PDR y muestra de DBS, para la EC en farmacias comunitarias en Barcelona (España).

4

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Los resultados de la presente Tesis Doctoral están recogidos en dos artículos publicados en revistas indexadas y dos trabajos pendientes de publicación.

4.1. ARTÍCULOS PUBLICADOS

Los artículos publicados que componen parte de los resultados de esta Tesis Doctoral son los siguientes:

Trabajo 1. Comparación de métodos de extracción de ADN y ensayos de PCR a tiempo real para el diagnóstico molecular de la enfermedad de Chagas crónica.

Título original: *Comparison of DNA extraction methods and real-time PCR assays for the molecular diagnostics of chronic Chagas disease.*

Autores: Silgado A, Moure Z, de Oliveira MT, Serre-Delcor N, Salvador F, Oliveira I, Molina I, Pumarola T, Ramírez JC, Sulleiro E.

Revista: Future Microbiology (Factor de Impacto: 3,553; Q3 en Microbiología).

Fecha publicación: Agosto 2020.

DOI: 10.2217/fmb-2020-0023.

Reproducido de Future Microbiol. (2020) 15(12), 1139-1145 con permiso de Future Medicine Ltd.

Resumen


Objetivo: Comparar la sensibilidad final de cuatro protocolos combinando dos métodos de extracción de ADN y dos ensayos de PCR a tiempo real para la detección de ADNsat de *T. cruzi* en muestras de sangre de pacientes con infección crónica.

Material y métodos: Se analizaron 98 muestras sanguíneas mediante dos métodos de extracción de ADN (uno automatizado y otro manual) y dos parejas de cebadores dirigidas a la amplificación de ADNsat de *T. cruzi* (un conjunto habitualmente empleado y otro diseñado recientemente).

Resultados: Con el método de extracción de ADN manual se obtuvieron porcentajes de positividad mayores respecto al automatizado, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas (53-56% vs. 45-47%, respectivamente, $p>0,05$). En ambos sistemas, la positividad fue mayor al utilizar el nuevo conjunto de cebadores para la PCR a tiempo real ($p>0,05$). De la misma manera, se obtuvieron valores de Ct más bajos cuando las muestras fueron analizadas con la nueva pareja de cebadores (29,64 vs. 32,64 para el sistema automatizado [$p<0,001$] y 30,01 vs. 31,01 para el sistema manual [$p<0,05$]). El número de muestras inhibidas o con valores del IAC fuera de rango fue superior en el caso del sistema manual (8 vs. 4 muestras).

Conclusiones: El uso de sistemas automatizados de extracción de ADN presenta resultados comparables a la extracción manual y un menor número de inhibiciones, lo cual facilita la implementación de las técnicas moleculares cuando se requiere analizar un elevado número de muestras. El nuevo set de cebadores presenta mejores resultados de sensibilidad que el descrito previamente para la detección de ADN de *T. cruzi* en pacientes con infección crónica.

Comparison of DNA extraction methods and real-time PCR assays for the molecular diagnostics of chronic Chagas disease

Aroa Silgado¹, Zaira Moure¹, Maykon T de Oliveira², Núria Serre-Delcor³, Fernando Salvador⁴, Inés Oliveira³, Israel Molina⁴, Tomàs Pumarola¹, Juan C Ramírez^{*,5}  & Elena Sulleiro¹

¹Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

²Departamento de Clínica Médica, Unidade de Cardiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Brazil

³Tropical Medicine Unit Vall d'Hebron-Drassanes, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

⁴Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

⁵Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatala Chaben" (INP-ANLIS), Buenos Aires, Argentina

*Author for correspondence: jramirez@dna.uba.ar

Aim: This work aimed to compare the sensitivity of four protocols for the detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in 98 blood samples from chronic Chagas disease patients. **Materials & methods:** Two DNA extraction (automated and manual) methods and two *T. cruzi* satellite DNA qPCRs (with a recent design and the usually used set of primers) were analyzed. **Results:** Both DNA extraction methods and qPCR assays tested in this work gave comparable qualitative results, although the lowest Ct values were obtained when samples were analyzed using the new set of primers for *T. cruzi* satellite DNA. **Conclusion:** Our results encourage the implementation of automated DNA extraction systems and the new *T. cruzi* qPCR for the molecular diagnostics and treatment response monitoring of chronic Chagas disease patients.

First draft submitted: 28 January 2020; Accepted for publication: 31 July 2020; Published online: 21 September 2020

Keywords: Chagas disease • clinical trials • DNA extraction • molecular diagnostics • real-time PCR • treatment monitoring • *Trypanosoma cruzi*

Chagas disease (CD) is a parasitic infection caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*, with about 6–7 million people infected worldwide [1]. CD is a major public health problem not only in Latin America, where it is endemic, but also in other regions such as Europe, North America, Japan and Australia, mainly due to migration movements [2].

The acute phase of infection, usually asymptomatic, is characterized by a high parasitemia, allowing *T. cruzi* detection in blood samples by microscopy or PCR. However, during the chronic stage, there is a dramatic reduction of parasite burden and the diagnosis of CD is based on serological methods [3]. Since chronic patients may remain seropositive many years after treatment, the detection of *T. cruzi* DNA by real-time PCR has been used as a biomarker of therapeutic response in short-term clinical trials of chronic CD [4–7].

The low sensitivity of PCR assays for the molecular diagnostics of *T. cruzi* chronic infection is mostly attributed to the low and intermittent parasite load of chronic patients [3,8]; however, the DNA extraction method and the PCR assay used for sample analysis may also play a decisive role [8]. In clinical trials of chronic CD in which a positive PCR result during the screening phase is mandatory for patient enrolment, this low PCR sensitivity implies that a larger number of subjects should be tested to complete the number of patients to be randomized.

The most used PCR assay for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection and therapeutic response monitoring in clinical trials of chronic CD is composed of a spin column-based DNA extraction method and a *T. cruzi* satellite DNA (SatDNA) qPCR designed by Piron *et al.* [9,10]. Recently, a new set of primers targeted to SatDNA sequences,

not yet tested in clinical samples, has shown a higher sensitivity against *T. cruzi* stocks from discrete typing units (DTUs) TcI-TcVI in comparison to the original qPCR assay [11].

In studies like clinical trials that require the analysis of a large number of samples, it is highly recommended the use of automated DNA extraction systems [12,13]. In general, automated and manual (spin column based) extraction methods have comparable efficiencies of DNA recovery and PCR inhibitors elimination, but automated systems decrease results variability, require less hands-on time, and reduce the risk of cross-contamination in molecular biology laboratories [12–15].

This work aimed to compare the sensitivity of four protocols, based on the combination of two DNA extraction methods and two qPCR assays, including an automated DNA extraction system and the new set of SatDNA primers, for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection and post-treatment follow-up monitoring of chronic CD patients during MULTIBENZ clinical trial (NCT03191162).

Materials & methods

Ethics statement

The samples used in this work were collected during the MULTIBENZ clinical trial (NCT03191162). This study was approved by the Medicines Research Ethics Committees of the Vall d'Hebrón University Hospital (HUVH), according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. Written informed consent forms were signed by the study subjects. All samples were anonymized before being analyzed.

Patients & blood samples

A total of 98 blood samples from Latin American migrants residing in Barcelona were collected from April 2017 to September 2018 during the screening phase of the MULTIBENZ study. The inclusion criteria were adults (> 18 years old) diagnosed with chronic CD by two different serological tests, who had not been previously treated with Benznidazole or Nifurtimox. Neither pregnant nor immunocompromised subjects were included.

Five ml of blood samples were mixed with an equal volume of 6 M Guanidine hydrochloride – 0.2 M EDTA pH 8 buffer (GEB), kept at room temperature for 72 h, and stored at 4°C until DNA extraction.

DNA extraction methods

The DNA extraction was performed using two different methodologies:

- Nuclisense easyMAG (bioMérieux Diagnostics, Marcy-l'Étoile, France), an automated system based on magnetic silica particles. The DNA was extracted from 200 µl of GEB samples and eluted in 55 µl of the elution buffer, as recommended by the manufacturer.
- High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), based on glass fiber spin columns. The DNA was extracted from 300 µl of GEB samples and eluted in 100 µl of the elution buffer, as previously described [10].

In both cases, 200 pg of an internal amplification control (IAC) were added at the beginning of each DNA extraction [10], and eluted DNAs were kept at -20°C until qPCR analysis. A seronegative GEB sample was included in every DNA extraction procedure as a negative control.

Real-time PCR assays

Two duplex qPCR assays were compared (Table 1). The qPCR_1 was the widely used protocol targeted to *T. cruzi* SatDNA and IAC sequences [10], whereas the qPCR_2 was a modification of qPCR_1 using a new set of primers for each molecular target.

Both qPCR assays were performed on duplicates using the FastStart Universal Probe Master Mix (Roche Diagnostics) with 5 µl of DNA sample in a final volume of 25 µl. Amplifications were carried out in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, CA, USA). The cycling conditions were an initial step of 15 min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 58°C for 1 min.

Negative (nuclease-free water) and positive (clinical sample with threshold cycle [Ct] = 31 ± 1) controls were included in every run, as recommended [16]. A sample was considered positive for *T. cruzi* DNA if at least one PCR replicate had a positive result.

Table 1. Primers and probes used for the detection of *T. cruzi* satellite DNA and IAC sequences in the two qPCR assays tested in this work.

Assay	Target	Oligonucleotide	Sequence 5'–3'	Final concentration (μM)	Amplicon size (bp)	Ref.
qPCR_1	<i>T. cruzi</i> SatDNA	cruzi1	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	0.4	166	[9]
		cruzi2	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	0.4		
		cruzi3 (probe)	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB	0.1		
	IAC	IAC-Fw	ACCGTCATGGAACAGCACGTA	0.08	180	[10]
		IAC-Rv	CTCCCGCAACAAACCTATAAAT	0.08		
		IAC-Tq (probe)	VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB	0.04		
qPCR_2	<i>T. cruzi</i> SatDNA	cruzi1c	TGAATGGYGGGAGTCAGAG	0.4	98	[11]
		cruzi2c	ATTCCTCCAAGMAGCGGAT	0.4		
		cruzi3 (probe)	FAM-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB	0.1		
	IAC	IAC-Fwc	GTCATGGAACAGCACGTACC	0.08	106	This work
		IAC-Rvc	ACACAGTATAAACCAAGACGAAAGC	0.08		
		IAC-Tq (probe)	VIC-AGCATCTGTTCTTGAAGGT-NFQ-MGB	0.04		

IAC: Internal amplification control.

Table 2. *T. cruzi* DNA detection in blood samples from chronic patients using the four protocols tested in this work.

Protocol	DNA extraction method	qPCR assay	Positive samples	Median Ct [IQR]
A	Magnetic particles	qPCR_1	45 (45.9%)	32.64 [31.12–34.58]
B		qPCR_2	47 (48.0%)	29.64 [29.04–32.10]
C	Spin columns	qPCR_1	53 (54.1%)	31.01 [29.93–32.70]
D		qPCR_2	56 (57.1%)	30.01 [27.96–32.81]

Ct: Threshold cycle; IQR: Interquartile range.

Statistical analysis

McNemar's test and Cohen Kappa coefficient [17] were used to analyzing the differences and the closeness of the agreement between the qualitative results of the four combinations of DNA extraction methods and qPCR assays, respectively. Kruskal-Wallis nonparametric analysis of variance was used to compare the Ct values grouped by DNA extraction method and qPCR assay. The Tukey's criterion was used to detect samples with outlier Ct values of IAC ($Ct > 75\text{th percentile} + 1.5 \times \text{interquartile range}$) [18,19]. Statistical analyses were done using SPSS Statistics v22.0 (SPSS Inc, IL, USA).

Results

A total of 98 GEB samples from patients with chronic CD were analyzed combining two DNA extraction methods and two *T. cruzi* SatDNA qPCRs. Table 2 resumes the results obtained for the four protocols.

Overall, DNA samples extracted with the spin column protocol had more positive qPCR results than those purified using the method based on magnetic particles ($p > 0.05$). On the other hand, both DNA extraction methods had more positive results when were combined with qPCR_2 than with qPCR_1 ($p > 0.05$).

Protocols C and D (both using the spin column DNA extraction method) had the highest number of samples with concordant qualitative results, considering both positive and negative samples, followed by protocols A and B (both using the automated system) (Table 3). Surprisingly, the lowest Cohen Kappa coefficient was found between protocols B and D (both using the qPCR_2), which had the highest number of samples with discordant results.

The Ct values for *T. cruzi* DNA were lower when samples were analyzed using qPCR_2 than with qPCR_1, regardless of the extraction method used (Table 2). Significant differences were found between the Ct values of protocols A and B ($p < 0.001$), A and C ($p < 0.01$), A and D ($p < 0.001$) and between C and D ($p < 0.05$). The lowest Ct values of IAC were also obtained when using qPCR_2, protocols B (19.65 [19.10–20.29]) and D (20.04 [19.73–20.31]), in comparison to those protocols using qPCR_1 ($p < 0.001$), A (20.74 [19.88–21.58]) and C (21.41 [20.85–22.10]).

Table 3. Cohen Kappa coefficient values for the comparison between the qualitative results of the four protocols tested in this work.

Protocols compared	Positive samples	Negative samples	Discordant samples	K value (95% CI)	Level of agreement
C–D	46	35	17	0.649 (0.498–0.800)	Substantial
A–B	36	42	20	0.590 (0.431–0.750)	Moderate
A–C	37	37	24	0.513 (0.346–0.681)	Moderate
B–C	37	35	26	0.471 (0.298–0.644)	Moderate
A–D	37	34	27	0.455 (0.284–0.626)	Moderate
B–D	34	29	35	0.290 (0.104–0.476)	Fair

K: Cohen Kappa coefficient.

A higher number of samples with outlier Ct values of IAC were found when DNA was extracted using the manual spin column method, protocols C (8) and D (7), than with the automated system, protocols A (0) and B (4). The four outlier samples for protocol B were negative for *T. cruzi* DNA, whereas most of the outlier samples for protocols C (7/8) and D (5/7) gave positive *T. cruzi* DNA results.

Discussion

The detection of *T. cruzi* DNA has been increasingly used as a surrogate biomarker of treatment response monitoring in clinical trials of chronic CD [5,20,21]. Most studies have used DNA extraction protocols based on spin columns [22–24], but these methods have important disadvantages when analyzing a large number of samples [12,13]. Therefore, the implementation of automated DNA extraction systems, as well as improving the sensitivity of current *T. cruzi* qPCR assays, may have a significant impact on the efficacy assessment of new antiparasitic treatments in future clinical trials of chronic CD.

Four combinations of DNA extraction methods and *T. cruzi* SatDNA qPCRs were compared in this work. The clinical sensitivity of the four protocols ranged between 46 and 57%, in agreement with previous studies conducted in non-endemic regions [25–27]. No significant differences were found between the qualitative results of automated and manual DNA extraction protocols, supporting the implementation of automated systems based on magnetic particles for the qPCR analysis of blood samples from chronic CD patients. This approach is particularly important in the case of clinical trials due to the advantages of automated over manual extraction methods, like high-throughput analysis and less risk of cross-contamination [12–15].

The slightly lower sensitivity of the protocols using the automated system in comparison to those combined with the manual method may be related to the volume of sample used for each DNA extraction procedure, 200 and 300 μ l, respectively. The sample volume for the automated extraction system was set in 200 μ l since during protocol standardization it was observed that larger volumes of GEB samples induced strong PCR inhibition. In this sense, a recent study reported that 56.5% of GEB samples showed PCR inhibition when DNA was extracted using an automated system based on magnetic particles, versus only 3.1% of PCR inhibition for EDTA-blood samples [28]. The same volume (400 μ l) used for both kinds of samples suggests magnetic particle DNA extraction systems may not be able to efficiently remove all guanidine-HCl, a well-known PCR inhibitor [29], present in larger volumes of GEB samples.

No significant differences were also found between the qualitative results of both *T. cruzi* SatDNA qPCRs. As expected, the highest agreements between both qPCR assays were obtained when DNAs were purified using the same extraction procedure, Kappa coefficient equal to 0.65 and 0.59 for manual and automated methods, respectively. In addition to the new set of *T. cruzi* SatDNA primers, the new qPCR assay incorporated a new set of primers targeted to the IAC sequence. This new set of IAC primers was designed to reduce the amplicon size of the original PCR reaction (180 bp) [10], making amplicon size and efficiency similar for both PCR reactions included in the TaqMan Multiplex qPCR [30], 98 bp for *T. cruzi* SatDNA [11] and 106 bp for IAC sequence.

Despite the lack of differences between the clinical sensitivity of both qPCR assays, the Ct values of the new SatDNA qPCR were lower than those from the original method, confirming the best performance of the new set of SatDNA primers, as previously reported by Ramirez *et al.* [11]. This new *T. cruzi* qPCR was recently used to analyze a panel of samples from 22 sylvatic and domestic mammalian species from Argentina, Colombia and Mexico [31]; but to our knowledge, this is the first time that the new set of SatDNA primers has been tested in clinical samples. However, further studies with a larger number of patients from different endemic regions will be necessary before

introducing the new SatDNA qPCR for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection and treatment response monitoring in clinical trials of chronic CD.

A higher number of samples with outlier Ct values of IAC, usually associated with the presence of PCR inhibitors or low yield of DNA extraction procedure [19,29], was found when using the manual spin column method. However, these samples were not excluded from the comparison because most of them had positive results for *T. cruzi* DNA and our analysis was only qualitative. In the case of quantitative studies, it is recommended that even positive samples with outlier Ct values of IAC be repeated since the parasite load could be underestimated [19,29]. The identification of IAC outliers with positive results for *T. cruzi* DNA seems to be related to the presence of glass fibers from the spin columns that co-elute with the DNA and may interfere with the fluorescence reading on HEX channel, without affecting the target detection on FAM channel [32].

Summarizing, our findings encourage the implementation of automated DNA extraction systems for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection and qPCR monitoring of treatment response in clinical trials of chronic CD. Moreover, this work supports the use of the new *T. cruzi* SatDNA qPCR in further studies with CD patients from different endemic regions and clinical scenarios.

Summary points

- Ninety eight samples from chronic patients were analyzed using two DNA extraction methods and two *T. cruzi* qPCRs.
- Both DNA extraction methods and *T. cruzi* qPCR assays tested in this work gave comparable qualitative results.
- The manual DNA extraction method showed a slightly higher sensitivity than the automated extraction system.
- The automated extraction system had fewer samples with outlier values of the internal amplification control.
- The lowest Ct values were obtained when samples were analyzed using the new *T. cruzi* satellite DNA qPCR.
- Our results encourage the use of automated extraction systems for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection.
- This work supports the use of the new *T. cruzi* SatDNA qPCR in further studies of chronic Chagas disease patients.

Author contributions

Conceptualization: E Sulleiro, JC Ramírez. Data curation & investigation: A Silgado, Z Moure, MT Oliveira, N Serre-Delcor, F Salvador, I Oliveira, I Molina, T Pumarola, JC Ramírez and E Sulleiro. Formal analysis: A Silgado, JC Ramírez. Funding acquisition: I Molina, E Sulleiro. Methodology: A Silgado, Z Moure. Writing-original draft: A Silgado, JC Ramírez. Writing-review & editing: A Silgado, Z Moure, MT Oliveira, N Serre-Delcor, F Salvador, I Oliveira, I Molina, T Pumarola, JC Ramírez and E Sulleiro.

Financial & competing interests disclosure

This work has been supported by the European Commission under the Health Innovation Work Programme of the 7th Framework Programme (grant HEALTH-305937). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical disclosure

Ethical Review Board approval was obtained from the Medicines Research Ethics Committees of the Vall d'Hebrón University Hospital (HUVH). In addition, written informed consent has been obtained from the study subjects.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest

1. WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) (2020). [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
2. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 102(Suppl. 1), 75–85 (2007).
3. Perez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. *Lancet* 391(10115), 82–94 (2018).
- **A recent review of clinical manifestations, diagnosis and treatment of Chagas disease.**
4. Molina I, Gomez i Prat J, Salvador F *et al.* Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 370(20), 1899–1908 (2014).

5. Pinazo M-J, Thomas MC, Bua J *et al.* Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12(4), 479–496 (2014).
- **Reviews the most important biomarkers for efficacy assessment of Chagas disease treatment.**
6. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S *et al.* Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69(8), 939–947 (2017).
7. Torrico F, Gascon J, Ortiz L *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet. Infect. Dis.* 18(4), 419–430 (2018).
8. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 184, 59–66 (2018).
- **A recent review of the state-of-the-art of the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection.**
9. Piron M, Fisa R, Casamitjana N *et al.* Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103(3), 195–200 (2007).
- **Presentation of the most used qPCR assay for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection.**
10. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC *et al.* Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(1), e2000 (2013).
11. Ramirez JC, Torres C, Curto M de LA, Schijman AG. New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11(12), e0006139 (2017).
- **Design of the new set of SatDNA primers for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection.**
12. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S *et al.* Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J. Clin. Lab. Anal.* 21(4), 244–248 (2007).
13. Dundas N, Leos NK, Mitui M, Revell P, Rogers BB. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *J. Mol. Diagn.* 10(4), 311–316 (2008).
14. Loens K, Bergs K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 45(2), 421–425 (2007).
15. Perandin F, Pollara PC, Gargiulo F, Bonfanti C, Nino M. Performance evaluation of the automated NucliSens easyMAG nucleic acid extraction platform in comparison with QIAamp Mini kit from clinical specimens. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 64(2), 158–165 (2009).
16. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 23(3), 550–576 (2010).
17. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33(1), 159–174 (1977).
18. Burns MJ, Nixon GJ, Foy CA, Harris N. Standardisation of data from real-time quantitative PCR methods - evaluation of outliers and comparison of calibration curves. *BMC Biotechnol.* 5, 31 (2005).
19. Ramirez JC, Cura CII, Moreira C *et al.* Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *J. Mol. Diagn.* 17(5), 605–615 (2015).
20. Porras AI, Yadon ZE, Altchek J *et al.* Target product profile (TPP) for Chagas disease point-of-care diagnosis and assessment of response to treatment. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9(6), e0003697 (2015).
21. Alonso-Padilla J, Abril M, Alarcon de Noya B *et al.* Target product profile for a test for the early assessment of treatment efficacy in Chagas disease patients: an expert consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14(4), e0008035 (2020).
- **Describes the characteristics of an ideal test for efficacy assessment of Chagas disease treatment.**
22. Moreira OC, Ramirez JD, Velazquez E *et al.* Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Trop.* 125(1), 23–31 (2013).
23. Wei B, Chen L, Kibukawa M, Kang J, Waskin H, Marton M. Development of a PCR assay to detect low level *Trypanosoma cruzi* in Blood specimens collected with PAXgene blood DNA tubes for clinical trials treating Chagas disease. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10(12), e0005146 (2016).
24. Parrado R, Ramirez JC, de la Barra A *et al.* Usefulness of serial blood sampling and PCR replicates for treatment monitoring of patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 63(2), e01191–18 (2019).
25. Munoz J, Gomez i Prat J, Gallego M *et al.* Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop.* 111(1), 51–55 (2009).
26. Murcia L, Carrilero B, Munoz MJ, Iborra MA, Segovia M. Usefulness of PCR for monitoring benznidazole response in patients with chronic Chagas' disease: a prospective study in a non-disease-endemic country. *J. Antimicrob. Chemother.* 65(8), 1759–1764 (2010).
27. Sulleiro E, Silgado A, Serre-Delcor N *et al.* Usefulness of real-time PCR during follow-up of patients treated with Benznidazole for chronic Chagas disease: experience in two referral centers in Barcelona. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14(2), e0008067 (2020).
28. Abras A, Ballart C, Llovet T *et al.* Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: a comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. *PLoS ONE* 13(4), e0195738 (2018).

29. Poma H, Davies C, Gutiérrez C, Mora M, Basombrio M, Rajal V. Comparison of nucleic acid extraction efficiency using different commercial kits and qPCR. Effect of inhibitors. *Rev. Argent. Microbiol.* 44(3), 144–149 (2012).
 30. Wang X, Seed B. High-throughput primer and probe design. In: *Real-time PCR*. (2006). Dorak M. (Ed.), 93–106
 31. Wehrendt DP, Gómez-Bravo A, Ramirez JC *et al.* Development and evaluation of a duplex TaqMan qPCR assay for detection and quantification of *Trypanosoma cruzi* infection in domestic and sylvatic reservoir hosts. *Parasit. Vectors* 12(1), 567 (2019).
 32. Ramirez JC, da Cruz Moreira O. Assessing parasite load in Chagas disease patients by quantitative multiplex real-time PCR. *Methods Mol. Biol.* 1955, 215–225 (2019).
- **A detailed protocol of the most used qPCR assay for the molecular diagnostics of *T. cruzi* infection.**

Trabajo 2. Evaluación analítica de la muestra de sangre seca y la prueba de diagnóstico rápido como nueva estrategia para el cribado serológico comunitario de la enfermedad de Chagas crónica.

Título original: *Analytical evaluation of dried blood spot and rapid diagnostic test as a new strategy for serological community screening for chronic Chagas disease.*

Autores: Silgado A, Gual-Gonzalez L, Sánchez-Montalvá A, Oliveira-Souto I, Goterris L, Serre-Delcor N, Esperalba J, Gomez-I-Prat J, Fernández-Naval C, Molina I, Pumarola T, Sulleiro E.

Revista: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Factor de Impacto: 6,073; Q1 en Microbiología).

Fecha publicación: Septiembre 2021.

DOI: 10.3389/fcimb.2021.736630.

Resumen

Objetivo: Evaluar la utilidad de las muestras de DBS procesadas mediante dos técnicas serológicas distintas, ELISA y E-CLIA, así como el uso de una PDR (*Trypanosoma Detect*TM) para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi*.

Material y métodos: Se analizaron un total de 162 muestras de sangre total de pacientes cribados para la infección crónica por *T. cruzi* (145 positivos y 17 negativos) y 25 muestras de sangre total de pacientes sin infección por *T. cruzi* (cribados para otras infecciones). Las muestras de sangre se recogieron retrospectivamente en papel Wattman y posteriormente se analizaron mediante ELISA y E-CLIA. Las muestras de sangre total también se utilizaron para evaluar la PDR escogida.

Resultados: Se observó una mejor correlación entre las muestras de suero con las de DBS analizadas mediante la técnica de E-CLIA que con las analizadas por ELISA (97% frente a 77% de sensibilidad, respectivamente). Ambos ensayos presentaron una especificidad del 100%. La mediana de los valores del índice de corte de E-CLIA para DBS fue significativamente más baja que los obtenidos para el suero (138,1 frente a 243,3; $p < 0,05$). La PDR *Trypanosoma Detect*TM presentó una sensibilidad y especificidad del 89,6% y del 100%, respectivamente.

Conclusiones: La detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* en muestras de DBS muestra una mayor sensibilidad cuando se analiza con la técnica de E-CLIA en comparación con el ensayo de ELISA. La prueba *Trypanosoma Detect*TM es más fácil de usar pero tiene una menor sensibilidad. Una estrategia secuencial basada en la realización de la PDR y la confirmación de los resultados negativos mediante DBS y E-CLIA, alcanza una elevada sensibilidad, facilitando su implementación a nivel comunitario.



Analytical Evaluation of Dried Blood Spot and Rapid Diagnostic Test as a New Strategy for Serological Community Screening for Chronic Chagas Disease

OPEN ACCESS

Edited by:

Roberto Saraiva,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil

Reviewed by:

Luiz Henrique Conde Sengenis,
Instituto Nacional de Infectologia
Evandro Chagas (INI), Brazil
Virginia Lorena,
Aggeu Magalhães Institute (IAM),
Brazil

*Correspondence:

Elena Sulleiro
esulleir@vhebron.net

[†]These authors have contributed
equally to this work

Author order was determined on the
basis of seniority

Specialty section:

This article was submitted to
Clinical Microbiology,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 14 July 2021

Accepted: 26 August 2021

Published: 15 September 2021

Citation:

Silgado A, Gual-Gonzalez L,
Sánchez-Montalvá A, Oliveira-Souto I,
Goterris L, Serre-Delcor N,
Esperalba J, Gomez-i-Prat J,
Fernández-Naval C, Molina I,
Pumarola T and Sulleiro E (2021)
Analytical Evaluation of Dried
Blood Spot and Rapid Diagnostic
Test as a New Strategy for
Serological Community Screening
for Chronic Chagas Disease.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 11:736630.
doi: 10.3389/fcimb.2021.736630

Aroa Silgado^{1†}, Lúdia Gual-Gonzalez^{2†}, Adrián Sánchez-Montalvá³, Inés Oliveira-Souto³, Lidia Goterris¹, Nuria Serre-Delcor³, Juliana Esperalba¹, Jordi Gomez-i-Prat³, Candela Fernández-Naval¹, Israel Molina³, Tomas Pumarola¹ and Elena Sulleiro^{1*}

¹ Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain, ² Laboratory of Vector-Borne and Zoonotic Diseases, Arnold School of Public Health, University of South Carolina, Columbia, SC, United States, ³ Department of Infectious Diseases-Drassanes, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain

Background: Chagas disease is a public health problem not only in Latin America, but also in other regions, including Spain, due to migration movements. Conventional serological diagnosis requires an invasive sample (plasma or serum) and a well-equipped laboratory. To circumvent those limitations, blood samples dried on filter paper (DBS) or Rapid Diagnostic Test (RDT) could be a practical alternative to reference protocol for serological screening in epidemiological studies. We evaluated the usefulness of dried blood sampling and a rapid diagnostic test (Trypanosoma Detect™) for the detection of antibodies against *T. cruzi* for their use in community-based screening.

Methodology/Principal Findings: A total of 162 stored paired whole-blood and serum samples from Latin American migrants and 25 negative-control blood samples were included. Diagnosis of chronic Chagas disease was performed in serum according to WHO algorithms. Blood samples were retrospectively collected as dried spots and then analyzed using two different serological techniques, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and electrochemiluminescence immunoassay (E-CLIA). Whole-blood samples were also used to evaluate a rapid diagnostic test based on immunochromatography. A better correlation with conventional serum was observed in dried blood elutes using E-CLIA than ELISA (97% vs. 77% sensitivity, respectively). Both assays reported 100% specificity. The median cut-off index values of E-CLIA for dried blood were significantly lower than those for serum (138.1 vs. 243.3, $P < 0.05$). The Trypanosoma Detect™ test presented a sensitivity and specificity of 89.6% and 100%, respectively.

Conclusions: The detection of antibodies against *T. cruzi* in dried blood samples shows a higher sensitivity when using E-CLIA compared with ELISA. Trypanosoma Detect™ is

easier to use but has a lower sensitivity. Hence, we propose a sequential strategy based on performing the rapid test first, and a negative result will be confirmed by DBS-ECLIA for use in community Chagas disease screening programs.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, dried blood spot (DBS), rapid diagnostic test (RDT), serological screening, community strategies

INTRODUCTION

Chagas disease (CD), a neglected tropical disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, is estimated to affect between 6 and 8 million people worldwide (World Health Organization, 2020). This vector-borne disease, endemic in Latin America, has changed its epidemiology due to population migrations out of the endemic area (Stanaway and Roth, 2015). Consequently, the number of reported cases of CD in European countries has increased in recent years, especially Spain (Requena-Méndez et al., 2015), which has the largest population of CD patients (Gómez i Prat et al., 2019).

Due to the psycho-emotional and socio-anthropological barriers that CD presents (Sanmartino et al., 2015), community screening is a fundamental tool to enhance the diagnosis of CD in order to offer integral management, including specific treatment. Despite improvements in diagnostic tools and screening programs for CD, there is still a large gap to cover in order to reach most of the susceptible population (Gómez i Prat et al., 2019).

The vast majority of CD patients living in non-endemic areas are in the chronic stage of the disease (Pérez-Molina et al., 2012). The diagnosis of this phase relies on the detection of IgG antibodies against *T. cruzi*. Serological assays, such as the indirect immunofluorescence assay, indirect haemagglutination, or enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) are commonly used (Rassi et al., 2012). The World Health Organization (WHO) guidelines recommend performing at least two different assays to diagnose the infection. All these serological assays present high sensitivity and specificity, nonetheless they are time-consuming, and technically demanding (Egüez et al., 2017). Furthermore, resources and personnel are required to perform the common serological tests (Egüez et al., 2017).

The use of serum/plasma limits the wider application to non-clinical settings, such as community screening programs (McDade et al., 2020). In order to circumvent this limitation, dried blood spots (DBS) from finger stick sampling has been explored. This type of sample is low cost, easy to collect, and simplifies the transport and storage of blood samples (Parker and Cubitt, 1999). Numerous uses for DBS, ranging from the diagnosis of infectious diseases to epigenetic studies, have been described elsewhere (McClendon-Weary et al., 2020).

For mass-screening surveys and intervention campaigns, a rapid, sensitive and easy-to-use diagnostic test would be valuable (Shah et al., 2014; Egüez et al., 2017). Currently, Rapid Diagnostic Tests (RDTs) have been developed for a range of tropical diseases, including *T. cruzi* infection (Reithinger et al.,

2010). These are defined as equipment-free devices and are less technically demanding and time consuming than classic serological techniques (Angheben et al., 2016; Angheben et al., 2019). In addition, they provide results within minutes (Angheben et al., 2016). Remarkably, many of them can be performed on whole finger stick blood (Shah et al., 2014).

This study aims to evaluate the utility of DBS sampling and RDT in the detection of antibodies against *T. cruzi* for their application in community CD screening studies.

MATERIALS AND METHODS

Study Population and Samples

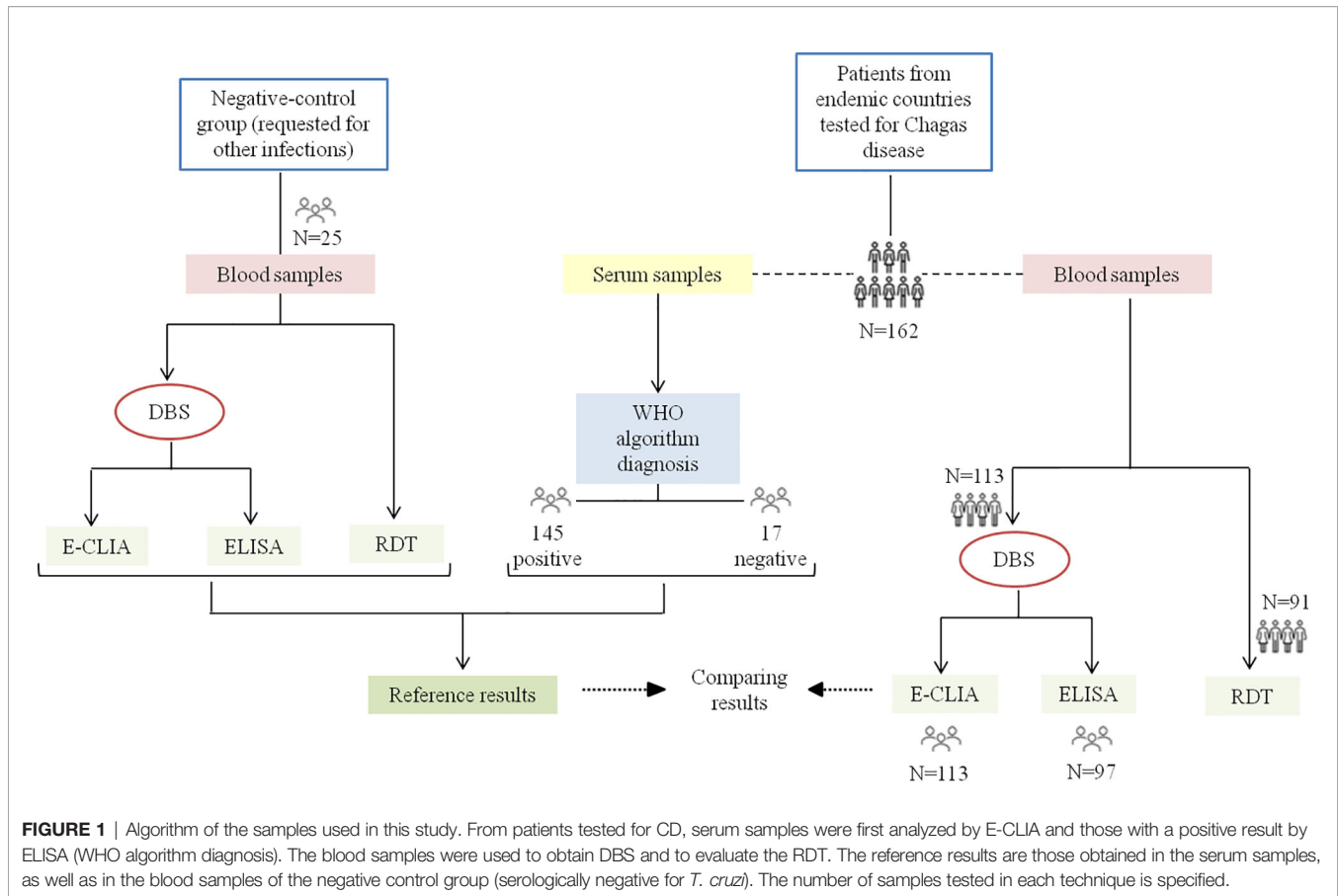
A total of 162 whole blood stored samples were used retrospectively from Latin American migrants from endemic CD countries that had a previous diagnosis for chronic Chagas disease. *T. cruzi* infection status of the enrolled patients was established based on the consensus results of two conventional assays for IgG anti-*T. cruzi* (Pan American Health Organization, 2019): serum samples were tested by an electrochemiluminescence immunoassay (E-CLIA) (Elecsys Chagas, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and those with a positive result were subsequently analyzed using a commercial ELISA (Ortho *T. cruzi* ELISA, Johnson & Johnson, High Wycombe, United Kingdom). Infection was confirmed when the serum sample was positive for both assays.

Both blood and serum samples were stored at 4°C and were analyzed at the latest one week after collection.

Of 162 blood samples, 113 were used to obtain DBS; all were then analyzed by E-CLIA and 97 by ELISA after their reconstitution. For the RDT study, 91 of the 162 blood samples were used. Not all samples could be evaluated in all tests due to the availability of reagents and material available for the study.

Twenty-five blood samples from patients with no travel history to *T. cruzi* endemic areas (samples to rule out other infections, i.e., Cytomegalovirus or BK virus), were used as the negative-control group (Figure 1).

Fifty µL of whole blood were used to fill one 8-mm-diameter circle on filter-paper cards (Whatman 903TM Specimen Collection Paper; GE Healthcare Ltd, Cardiff, United Kingdom). This procedure was repeated to fill two circles. Each card was dried overnight at room temperature (approximately 25°C) and the elution of DBS was carried out the day after drying. For their reconstitution, both two paper circles were placed in 300 µL of phosphate-buffer saline (PBS) and incubated overnight with gentle



rotation at room temperature (Holguín et al., 2013). The Whatman paper was then carefully removed and the eluted blood spots were centrifuged for 2 minutes at 12500 rpm to clear away any remaining paper from the supernatant and stored at 4°C until analysis (within 1-2 days after reconstitution).

Detection of IgG Anti-*T. cruzi* in DBS

The presence of IgG antibodies against *T. cruzi* was determined in the eluted DBS samples using two different techniques:

(1) Elecsys Chagas (Roche Diagnostics), an automated E-CLIA for the qualitative determination of antibodies to *T. cruzi*, following the manufacturer's instructions and analyzed with the automated COBAS 8000 analyzer (Roche Diagnostics).

(2) Chagas ELISA IgG+IgM (Vircell Microbiologists, Granada, Spain), following the manufacturer's instructions and using automated equipment, the DS2 ELISA Processor (Dynex Technologies, Chantilly, VA).

Results for both serum and DBS were interpreted according to the Elecsys Chagas assay manufacturer's cut-off value: samples with cut-off index (COI) values of ≥ 1.0 were considered reactive, while < 1.0 were labeled as non-reactive. For the Chagas ELISA IgG+IgM system, DBS samples were considered positive if the antibody index (sample optical density/cut-off serum mean optical density) was above 1.1, grey area if antibody index was 0.9-1.1, and negative if antibody index was below 0.9.

Rapid Diagnostic Test

The Trypanosoma Detect™ Rapid Test (InBios International, Inc., Seattle, WA) was also evaluated. A total of 20 μL of whole blood was used and processed according to the manufacturer's instructions.

Statistical Analysis

The relative sensitivity (S; true positive/total positive) and relative specificity (E; true negative/total negative) from each test were calculated. Qualitative variables were expressed as absolute frequencies and percentages, and quantitative variables as the median and interquartile range (IQR). Continuous variables were compared using the *t*-test or Mann-Whitney U test when appropriate. The Cohen Kappa coefficient was used to analyze the level of agreement between tests. An appropriate cut-off value for the DBS samples in the Elecsys Chagas (E-CLIA) assay was determined using a receiver operating characteristic (ROC) curve. The Youden index was calculated, which is a measure of the overall discriminative power of a diagnostic procedure.

Statistical analyses were carried out using the R Studio software version 3.5.3 (R Development Core Team, Vienna, Austria).

Ethics Statement

This study is based on retrospective stored samples from Latin American patients attended at the Hospital Universitari Vall

d’Hebrón (HUVH). Review Board approvals (PR(SC)253/2012) were obtained from the Ethics Committee of the Vall d’Hebron Research Institute, according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki. All samples were anonymized before being analyzed.

RESULTS

A total of 162 blood samples from 145/162 (89.5%) patients positive for *T. cruzi* infection and 17/162 (10.5%) negative for *T. cruzi* infection were evaluated in this study.

Overall, **Figure 2** summarizes the samples tested with each methodology and the results obtained from the comparison with the reference results.

DBS E-CLIA shows the best agreement, achieving an S of 96.9% [95% confidence interval (CI), 90.5 to 99.2]. Serum COI values were higher than those obtained with DBS; the median value for serum was 243.3 (IQR, 195.9 to 286.3), while the median value for DBS was 138.1 (71.7 to 204.4) (p-value <0.05). The distribution of the COI values for both methodologies is shown in **Figure 3**.

Compared with serum, 3/138 (2.2%) DBS samples were inappropriately classified as negative. COI values in the respective serum sample indicated that these three samples had low IgG anti-*T. cruzi* levels [DBS median, 0.5 (0.3 to 0.6) vs. serum median, 9.7 (7 to 10.8)].

Taking serum sample results as the reference method, the S and E for all potential COI values for the DBS samples in E-CLIA were obtained by means of a ROC curve (**Figure 4**).

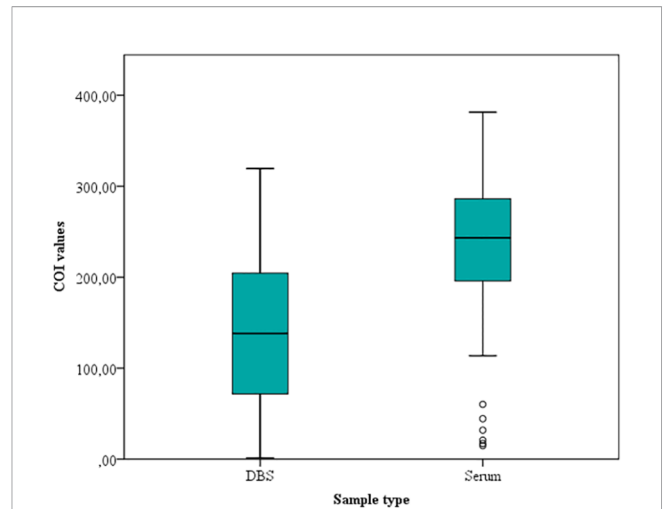


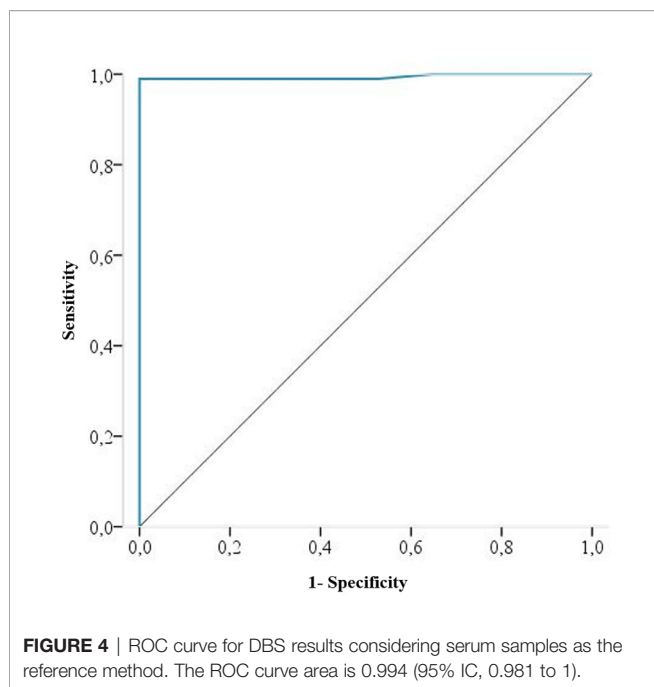
FIGURE 3 | Dried Blood Spot and serum COI values obtained by the Elecsys Chagas assay.

The performance of E-CLIA on DBS samples improves when the cut-off threshold changes from ≥ 1 to ≥ 0.31 , achieving an S and E of 99% and 100%, respectively. Correspondingly, the false-negative samples decreased from three to one.

The lowest Cohen Kappa coefficient was found between DBS-ELISA and reference results, which had the highest number of samples with discordant results. In particular, 21/122 (17.2%) samples with a false-negative result were reported, lowering the S to 77.4% (95% CI, 67.4 to 85.2%). All these 21 DBS samples



FIGURE 2 | Comparison of *T. cruzi* diagnostic performance on DBS samples and RDT. The number of samples tested with each methodology is specified, also whether they were positive or negative and whether they were samples from patients with other infections (serologically negative for *T. cruzi*). +, samples testing positive for IgG anti-*T. cruzi*; -, samples testing negative for IgG anti-*T. cruzi*; OI, other infections: samples from individuals tested for other infections; 95% CI, 95% confidence interval.



were positive when analyzed by E-CLIA (in both DBS and serum samples).

As regards RDT, 8/77 (10.4%) E-CLIA serum positive samples were misclassified as negative, reaching an S of 89.6% (95% CI, 80 to 95.1). In this group of false-negatives, the median COI value in paired serum samples was 16.1 (IQR, 11.3 to 43.1), while the median value in serum samples for the true-positive group was 202.9 (IQR, 83.5 to 244.4), with a statistically significant difference (p-value <0.001).

In all techniques, the E was 100% (95% CI, 89.7 to 99.8 for E-CLIA, 85.4 to 99.7 for ELISA, and 88.8 to 99.8 for RDT).

DISCUSSION

CD is a potentially life-threatening illness with a high percentage of un-diagnosed cases in non-endemic countries as Spain (Basile et al., 2011; World Health Organization, 2020).

Therefore, it is essential to improve access to CD diagnosis and treatment and community-based testing would be a good strategy (Gómez i Prat et al., 2020). In this study, we evaluated two diagnostic procedures that could be applied in serological screening programs: sample collection through DBS and an RDT.

DBS sampling offers a good alternative to conventional serum samples, for those situations where there are no facilities or expertise to properly obtain, transport and store blood specimens (Tuailon et al., 2020). Blood collection on DBS can be performed using a finger stick in adults and older children or a heel-prick in neonates and infants, making it more suitable for screening programs (Kania et al., 2013).

In the present study, DBS sampling analyzed by the E-CLIA technique the results obtained were comparable to conventional serum samples, reaching a sensitivity and specificity of 96.9% and 100%, respectively. A similar sensitivity was reported in the

study of Holguín et al. (2013). However, they reported a lower specificity, which may be due to the fact that they tested a greater number of negative samples.

The amount of reconstituted elute from filter paper can vary depending on several factors, such as blood volume, collection and reconstitution protocols, as well as the sample storage (Rodríguez-Pérez et al., 1999; McClendon-Weary et al., 2020). In our study, lower COI values were reported for DBS samples than for serum samples (median of 138.1 vs. 243.30). Moreover, we detected 3 false-negatives (two of them also negative with the RDT); probably due to the lower antibody titres in DBS samples than in serum due to sample dilution. Recalculating the cut-off value would be useful to determine an optimal antibody recovery protocol and improve detection in patients with low antibody titres (Holguín et al., 2013). The new cut-off determined for DBS samples was much lower than for serum samples (≥ 0.31 vs. ≥ 1 , respectively), with the consequent risk of leading to an erroneous interpretation. Therefore, a future study including a larger number of samples would be necessary to accurately determine a cut-off value for DBS samples analyzed by Elecsys Chagas.

With ELISA, the sensitivity drops to 77.4%, with a high number of false-negative results (21 out of 122 samples). The most likely reason for this low correspondence with serum diagnosis could be that the paper scraps left behind could interfere with the correct reading of the samples. Unfortunately, due to the small volume of the samples, the analyses of discrepant samples could not be repeated. Higher sensitivity is also observed in serum samples when comparing with the results obtained by E-CLIA with ELISA (Antinori et al., 2018).

Differences in the analytical performance of DBS when analyzed by two different techniques (E-CLIA and ELISA) were found. Thus, a previous evaluation of DBS samples would be suitable to determine the accuracy of the diagnostic technique which will be used.

In recent years, the use of rapid tests to diagnose infectious disease has increased, including CD. The RDTs provide rapid, reliable, and accurate results if the test used is sensitive and specific (Sánchez-Camargo et al., 2014).

In our study, the performance data (S: 89.6% and E: 100%) obtained was close to the data reported in other studies using the same rapid test (Brutus et al., 2008; Lorca et al., 2008; Bern et al., 2009; Reithinger et al., 2010; Sánchez-Camargo et al., 2014). Other studies, using an improved version of this test (Shah et al., 2014), have also reported high sensitivity (Shah et al., 2014; Egüez et al., 2017). Interestingly, they used whole blood from a finger stick, as would be the idea in screening programmes.

RDTs are recommended for screening and surveillance in both endemic and non-endemic areas (Sánchez-Camargo et al., 2014). In non-endemic countries, with a low prevalence, the choice of using RDT for the screening of individuals should be followed by confirmation of the results in a reference laboratory (Sánchez-Camargo et al., 2014; Angheben et al., 2016).

A strategy based on a single RDT would be advantageous in terms of accessibility thus facilitating its implementation at the community level, but the sensitivity of RDT reflected in our study (89%) was not sufficient. Based on the results obtained in this study, the proposed strategy is based on the combined use of

the rapid test with the subsequent confirmation of negative cases by means of the corresponding DBS sample analyzed with a more sensitive technique, such as E-CLIA, to reach a sensitivity of 97%. However, the addition of the DBS sampling involves restructuring the field equipment in order to be able to carry out the tests in the shortest possible time.

It is important to apply more effective strategies to strengthen the capacity of health systems to detect CD cases. Some endemic areas are initiating strategies to enhance access to diagnosis and therefore working on early treatment. However, in non-endemic areas, where access to diagnosis is not a problem, the main challenge is the lack of information from health professionals with policymakers about the need for screening and specific guidelines (Alonso-Padilla et al., 2019). Therefore, it is essential to know the true prevalence of *T. cruzi* among Latin American migrants in order to design an efficient screening strategy (Da Costa-Demaurex et al., 2019). Community-based activities allow us to get closer to the population at risk and are necessary to overcome psycho-emotional and socio-anthropological barriers. At the same time, they offer an on-site diagnosis, which has been shown to be very effective in other studies conducted in Europe (Navarro et al., 2011; Repetto et al., 2015; Navarro et al., 2017; Da Costa-Demaurex et al., 2019; Gómez i Prat et al., 2020).

Our study does, however, have limitations due to its retrospective nature. For example, the study lacks information regarding epidemiological and clinical data of the enrolled patients. Additionally, the DBS sampling and RDT were not performed on finger stick samples, as would be the idea in a community screening programme. Therefore, a field community study using whole blood from finger sticks would be interesting to confirm the present data and to evaluate these options in the right context.

To conclude, the use of DBS plus E-CLIA (Elecsys Chagas) could be a good option for the detection of IgG anti-*T. cruzi*, with an analytical performance similar to that obtained with conventional serology. Nevertheless, DBS specimens should be evaluated in the diagnostic technique to be used. Moreover, it would be desirable to evaluate an optimum cut-off value of Elecsys Chagas for DBS before processing this type of sample. The RDT (Trypanosoma Detect™) rendered a good performance for the rapid diagnosis of CD, with adequate sensitivity and specificity, but not sufficient to be used as the sole test in screening community programmes. Therefore, based in our results, we propose a sequential strategy based on, first, performing the easy-to-use rapid test and, second, confirming the negatives with a more sensitive technique, DBS E-CLIA, for

implementation under field conditions or screening programs outside of health facilities. However, considering the limitations presented in this study, a future trial would be necessary to test such a strategy.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material. Further inquiries can be directed to the corresponding author.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Vall d'Hebron Research Institute. Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization: ES. Methodology: AS and LG-G. Formal analysis: AS and LG-G. Data curation & Investigation: AS, LG-G, AS-M, IO-S, LG, NS-D, JE, JG-i-P, CF-N, IM, TP, and ES. Writing-Original draft: AS and LG-G. Writing-Review & Editing: AS, LG-G, AS-M, IO-S, LG, NS-D, JE, JG-i-P, CF-N, IM, TP, and ES. Funding acquisition: IO-S and AS-M. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work has been supported by the Fundació la Marató TV3 (project number 20182610).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Helena Kruyer for her assistance with the English.

REFERENCES

- Alonso-Padilla, J., Cortés-Serra, N., Pinazo, M. J., Bottazzi, M., Abril, M., Barreira, F., et al. (2019). Strategies to Enhance Access to Diagnosis and Treatment for Chagas Disease Patients in Latin America. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 17 (3), 145–157. doi: 10.1080/14787210.2019.1577731
- Angehen, A., Buonfrate, D., Cruciani, M., Jackson, Y., Alonso-Padilla, J., Gascon, J., et al. (2019). Rapid Immunochromatographic Tests for the Diagnosis of Chronic Chagas Disease in At-Risk Populations: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (5), 1–15. doi: 10.1371/journal.pntd.0007271
- Angehen, A., Gobbi, F., Buonfrate, D., Tais, S., Degani, M., Anselmi, M., et al. (2016). Notes on Rapid Diagnostic Tests for Chronic Chagas Disease. *Bull. La Soc. Pathol. Exot.* 110 (1), 9–125. doi: 10.1007/s13149-017-0546-6

- Antinori, S., Galimberti, L., Grande, R., Bianco, R., Oreni, L., Traversi, L., et al. (2018). Chagas Disease Knocks on Our Door: A Cross-Sectional Study Among Latin American Immigrants in Milan, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* 24 (12), 1340.e1–1340.e6. doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.017
- Basile, L., Jansà, J. M., Carlier, Y., Salamanca, D. D., Angehen, A., Bartoloni, A., et al. (2011). Chagas Disease in European Countries: The Challenge of a Surveillance System. *Eurosurveillance* 16 (37), 3. doi: 10.2807/ese.16.37.19968-en
- Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R. H., LaFuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., et al. (2009). Congenital Trypanosoma Cruzi Transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin. Infect. Dis.* 49 (11), 1667–1674. doi: 10.1086/648070
- Brutus, L., Schneider, D., Postigo, J., Romero, M., Santalla, J., and Chippaux, J. P. (2008). Congenital Chagas Disease: Diagnostic and Clinical Aspects in an Area

- Without Vectorial Transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop.* 106 (3), 195–199. doi: 10.1016/j.actatropica.2008.03.009
- Da Costa-Demaurex, C., Cárdenas, M. T., Aparicio, H., Bodenmann, P., Genton, B., and D'Acremont, V. (2019). Screening Strategy for Chagas Disease in a Non-Endemic Country (Switzerland): A Prospective Evaluation. *Swiss Med. Wkly.* 149 (13–14), 1–7. doi: 10.4414/smww.2019.20050
- Egüez, K. E., Alonso-Padilla, J., Terán, C., Chipana, Z., García, W., Torrico, F., et al. (2017). Rapid Diagnostic Tests Duo as Alternative to Conventional Serological Assays for Conclusive Chagas Disease Diagnosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11 (4), 1–11. doi: 10.1371/journal.pntd.0005501
- Gómez i Prat, J., Peremiquel-Trillas, P., Claveria Guiu, I., Choque, E., Oliveira Souto, I., Serre Delcor, N., et al. (2019). A Community-Based Intervention for the Detection of Chagas Disease in Barcelona, Spain. *J. Commun. Health* 44 (4), 704–711. doi: 10.1007/s10900-019-00684-z
- Gómez i Prat, J., Peremiquel-Trillas, P., Guiu, I. C., Mendivelso, J. C., Choque, E., los Santos, J. J., et al. (2020). Comparative Evaluation of Community Interventions for the Immigrant Population of Latin American Origin at Risk for Chagas Disease in the City of Barcelona. *PLoS One* 15 (7), 1–15. doi: 10.1371/journal.pone.0235466
- Holguín, A., Norman, F., Martín, L., Mateos, M. L., Chacón, J., López-Vélez, R., et al. (2013). Dried Blood as an Alternative to Plasma or Serum for Trypanosoma Cruzi IgG Detection in Screening Programs. *Clin. Vaccine Immunol.* 20 (8), 1197–12025. doi: 10.1128/CVI.00221-13
- Kania, D., Bekalé, A. M., Nagot, N., Mondain, A. M., Ottomani, L., Meda, N., et al. (2013). Combining Rapid Diagnostic Tests and Dried Blood Spot Assays for Point-Of-Care Testing of Human Immunodeficiency Virus, Hepatitis B and Hepatitis C Infections in Burkina Faso, West Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* 19 (12), 12–18. doi: 10.1111/1469-0691.12292
- Lorca, M., Contreras, M., Salinas, P., Guerra, A., and Raychaudhuri, S. (2008). Evaluación De Una Prueba Rápida Para El Diagnóstico De La Infección Por Trypanosoma Cruzi En Suero TT - Evaluation of a Rapid Diagnosis Test for Trypanosoma Cruzi Infection in Serum Sample. *Parasitol. Latinoam* 63 (1/4), 29–33. doi: 10.4067/S0717-77122008000100005
- McClendon-Weary, B., Putnick, D. L., Robinson, S., and Yeung, E. (2020). Little to Give, Much to Gain—What Can You Do With a Dried Blood Spot? *Curr. Environ. Heal. Rep.* 7 (3), 211–215. doi: 10.1007/s40572-020-00289-y
- McDade, T., McNally, E., D'Aquila, R. T., Mustanski, B., Miller, A., Vaught, L., et al. (2020). Enzyme Immunoassay for SARS-CoV-2 Antibodies in Dried Blood Spot Samples: A Minimally-Invasive Approach to Facilitate Community- and Population-Based Screening. *medRxiv* 1–11. doi: 10.1101/2020.04.28.20081844
- Navarro, M., Berens-Riha, N., Hohnerlein, S., Seiringer, P., Saldern, C.V., Garcia, S., et al. (2017). Cross-Sectional, Descriptive Study of Chagas Disease Among Citizens of Bolivian Origin Living in Munich, Germany. *BMJ Open* 7 (1), 1–9. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013960
- Navarro, M., Perez-Ayala, A., Guionnet, A., Perez-Molina, J. A., Navaza, B., Estévez, L., et al. (2011). Targeted Screening and Health Education for Chagas Disease Tailored to At-Risk Migrants in Spain 2007 to 2010. *Eurosurveillance* 16 (38), 1–5. doi: 10.2807/ese.16.38.19973-en
- Pan American Health Organization. (2019). *Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Chagas Disease* (Washington, D.C.: Pan American Health Organization).
- Parker, S. P., and Cubitt, W. D. (1999). The Use of the Dried Blood Spot Sample in Epidemiological Studies. *J. Clin. Pathol.* 52 (9), 633–395. doi: 10.1136/jcp.52.9.633
- Pérez-Molina, J. A., Norman, F., and López-Vélez, R. (2012). Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. *Curr. Infect. Dis. Rep.* 14 (3), 263–745. doi: 10.1007/s11908-012-0259-3
- Rassi, A. Jr., Rassi, A., and Marcondes de Rezende, J. (2012). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26 (2), 275–915. doi: 10.1016/j.idc.2012.03.002
- Reithinger, R., Grijalva, M. J., Chiriboga, R. F., Noya, B.A.De, Torres, J. R., Pavia-Ruz, N., et al. (2010). Rapid Detection of Trypanosoma Cruzi in Human Serum by Use of an Immunochromatographic Dipstick Test. *J. Clin. Microbiol.* 48 (8), 3003–3007. doi: 10.1128/JCM.02474-09
- Repetto, E. C., Zachariah, R., Kumar, A., Angheben, A., Gobbi, F., Anselmi, M., et al. (2015). Neglect of a Neglected Disease in Italy: The Challenge of Access-to-Care for Chagas Disease in Bergamo Area. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (9), 1–13. doi: 10.1371/journal.pntd.0004103
- Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A. J., et al. (2015). Prevalence of Chagas Disease in Latin-American Migrants Living in Europe: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2), 1–15. doi: 10.1371/journal.pntd.0003540
- Rodríguez-Pérez, M. A., Danis-Lozano, R., Rodríguez, M. H., and Bradley, J. E. (1999). Application of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Antibodies to Onchocerca Volvulus on Filter-Paper Blood Spots: Effect of Storage and Temperature on Antibody Decay. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 93 (5), 523–245. doi: 10.1016/S0035-9203(99)90363-2
- Sánchez-Camargo, C. L., Albajar-Viñas, P., Wilkins, P. P., Nieto, J., Leiby, D. A., Paris, L., et al. (2014). Comparative Evaluation of 11 Commercialized Rapid Diagnostic Tests for Detecting Trypanosoma Cruzi Antibodies in Serum Banks in Areas of Endemicity and Nonendemicity. *J. Clin. Microbiol.* 52 (7), 2506–2512. doi: 10.1128/JCM.00144-14
- Sanmartino, M., Saavedra, A. A., Gomez i Prat, J., Barba, M. C., and Albajar-Viñas, P. (2015). Do Not Be Afraid of Us: Chagas Disease as Explained by People Affected by It. *Interf. Commun. Heal. Educ.* 19 (55), 1063–1755. doi: 10.1590/1807-57622014.1170
- Shah, V., Ferrufino, L., Gilman, R. H., Ramirez, M., Saenza, E., Malaga, E., et al. (2014). Field Evaluation of the InBios Chagas Detect Plus Rapid Test in Serum and Whole-Blood Specimens in Bolivia. *Clin. Vaccine Immunol.* 21 (12), 1645–1649. doi: 10.1128/CVI.00609-14
- Stanaway, J. D., and Roth, G. (2015). The Burden of Chagas Disease: Estimates and Challenges. *Glob. Heart* 10 (3), 139–445. doi: 10.1016/j.gheart.2015.06.001
- Tuailon, E., Kania, D., Pisoni, A., Bollore, K., Taieb, F., Ontsira Ngoyi, E. N., et al. (2020). Dried Blood Spot Tests for the Diagnosis and Therapeutic Monitoring of HIV and Viral Hepatitis B and C. *Front. Microbiol.* 11:373. doi: 10.3389/fmicb.2020.00373
- World Health Organization. (2020). *Chagas Disease (American Trypanosomiasis) 2020* (Washington, D.C.: Pan American Health Organization). Available at: [http://www.who.int/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Chagas-Disease-\(American-Trypanosomiasis\)](http://www.who.int/News-Room/Fact-Sheets/Detail/Chagas-Disease-(American-Trypanosomiasis)).

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Silgado, Gual-Gonzalez, Sánchez-Montalvá, Oliveira-Souto, Goterris, Serre-Delcor, Esperalba, Gomez-i-Prat, Fernández-Naval, Molina, Pumarola and Sulleiro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

4.2. TRABAJOS PENDIENTES DE PUBLICACIÓN

Los siguientes trabajos también contribuyen a los resultados de la presente Tesis Doctoral, pero a fecha de depósito de la misma aún no han sido publicados:

Trabajo 3. Utilidad de las réplicas de extracción de ADN para mejorar la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* en muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas crónica.

Título original: *Usefulness of DNA extraction replicates to enhancing the detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from patients with chronic Chagas disease.*

Autores: Silgado A, Ramírez JC, Moreira O, Bosch-Nicolau P, Martín O, Molina I, Sulleiro E.

Resumen

Objetivo: Evaluar la utilidad de realizar varias réplicas de extracción para mejorar la detección de ADN de *T. cruzi* tanto en la fase de cribado como en el seguimiento post-tratamiento de los pacientes incluidos en el ensayo clínico MULTIBENZ.

Material y métodos: Se cribaron un total de 553 pacientes, 159 en Argentina, 150 en Brasil, 92 en Colombia y 152 en España. En cada visita de estudio se recogió una muestra de sangre y se realizaron tres réplicas de extracción de ADN de cada muestra. A continuación, cada eluido obtenido se analizó por duplicado mediante PCR a tiempo real.

Resultados: Los porcentajes de positividad de la PCR a tiempo real previo al tratamiento aumentaron al realizarse tres réplicas de extracción respecto a una sola réplica: del 40,25% al 55,35% ($p<0,05$), del 38% al 60% ($p<0,05$), del 26,10% al 29,35% y del 33,55% al 42,10% en las cohortes de Argentina, Brasil, Colombia y España, respectivamente. Además, esta estrategia también aumentó la detección de fracasos de tratamiento del 18,92% al 27,03%, del 14,10% al 29,49% ($p<0,05$) y del 13,33% al 32% ($p<0,05$) para los regímenes de BNZ de dosis estándar, baja y corta, respectivamente.

Conclusiones: La realización de tres réplicas de extracción de ADN mejora la capacidad de detección del ADN de *T. cruzi* para el reclutamiento de pacientes con infección crónica en ensayos clínicos, como para la detección del fracaso del tratamiento durante el seguimiento posterior.

1 **Title:** Usefulness of DNA extraction replicates to enhancing the detection of
2 *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from patients with chronic Chagas disease

3

4 **Authors:** Aroa Silgado^{1,†}, Juan Carlos Ramirez^{2,†}, Otacilio Moreira^{3,†}, Pau Bosch-
5 Nicolau^{4,5}, Oihane Martín⁶, Israel Molina^{4,5,*}, and Elena Sulleiro^{1,5,*}

6 †Contributed equally to this work.

7 **Affiliations:**

8 ¹Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital. Universitat Autònoma
9 de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

10 ²Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas (LaBMECh), Instituto
11 de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular "Dr. Héctor N. Torres"
12 (INGEBI-CONICET), Buenos Aires, Argentina

13 ³Platform of Real Time PCR RPT09A, Laboratory of Molecular Virology, Oswaldo Cruz
14 Institute/Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil

15 ⁴Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron University Hospital. Universitat
16 Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

17 ⁵Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas
18 (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

19

20

21

22 ***Corresponding authors:**

23 Israel Molina, israelmolina@ymail.com

24 Elena Sulleiro, esulleir@vhebron.net

25

26

27

28 **ABSTRACT**

29 Benznidazole (BNZ) is the most widely used drug for the treatment of Chagas disease
30 (CD), although its efficacy in the chronic phase of CD is highly variable. Therefore,
31 several clinical trials have evaluated new BNZ therapy regimens for the treatment of
32 CD chronic patients. However, a drawback in these studies is the lack of a marker of
33 cure. Recently, techniques such as real-time PCR have been used as indirect
34 biomarkers for the detection of treatment failure. This study evaluated the utility of
35 performing extraction replicates to improve the positivity of real-time PCR for both
36 baseline detection and identification of therapeutic failure during post-treatment follow-
37 up in the context of the MULTIBENZ clinical trial.

38 Patients from Argentina (n=159), Brazil (n=150), Colombia (n=92), and Spain (n=152)
39 were enrolled. A blood sample was collected at each time point, and three DNA
40 extraction replicates were performed on each blood sample. Then, real-time PCR
41 duplicates were tested for each eluted sample.

42 Cumulative results of multiple DNA extraction replicates enhanced the positivity of real-
43 time in pretreated chronic patients from 40.25% to 55.35%, 38% to 60%, 26.10% to
44 29.35%, and 33.55% to 42.10% in Argentina, Brazil, Colombia, and Spain cohorts,
45 respectively. Moreover, this strategy also increased the proportion of treatment failure
46 detection by real-time PCR from 18.92% to 27.03%, 14.10% to 29.49%, and 13.33% to
47 32% for BNZ standard-, low-, and short-dosage regimens, respectively.

48 Performing three DNA extraction replicates improved the detection of *T. cruzi* DNA by
49 real-time PCR for both recruiting chronic CD patients into clinical trials and detecting
50 treatment failure during post-treatment follow-up.

51

52

53 INTRODUCTION

54 Chagas disease (CD), a parasitic infection caused by the flagellate protozoan
55 *Trypanosoma cruzi*, affects between 6 and 7 million people worldwide [1]. Although
56 only endemic in Latin America, it has emerged in the non-endemic areas, mainly USA
57 and Europe, due to migratory flows [2].

58 Clinical infection with *T. cruzi* occurs in two phases: acute and chronic. The acute
59 phase is usually asymptomatic; this is followed by a chronic phase if untreated. While
60 most remain asymptomatic for life, 30%–50% of chronic patients eventually develop
61 cardiac and/or digestive complications [5].

62 Since 1960, there have been only two drugs to treat CD: nifurtimox and benznidazole
63 (BNZ). Of these two, BNZ is the one most studied and most often used as a treatment
64 [6]. However, BNZ have a limited efficacy in the chronic stage of the infection and a
65 high rate of adverse events [5]. On this basis, clinical trials have been performed in
66 order to evaluate new schemes of BNZ. The MULTIBENZ study (Evaluation of Different
67 Benznidazole Regimens for the Treatment of Chronic Chagas Disease;
68 ClinicalTrials.gov, NCT03191162), a phase II, randomized, multicenter international
69 clinical trial, aimed to evaluate safety and efficacy of two (low- and short-dose) BNZ
70 dose schemes for the treatment of CD in chronic phase compared with the standard
71 BNZ dose [6].

72 A drawback of studies evaluating the efficacy of new treatments approaches in the
73 chronic phase of CD is the lack of a marker to define cure [7]. Due to the long-term
74 persistence of anti-*T. cruzi* IgG antibodies detected over several years [8], the current
75 cure criteria, based on the switch from positive to negative serology, limits its use in
76 clinical trials. In this context, detection of *T. cruzi* DNA in peripheral blood by real-time
77 PCR has been used as a biomarker of therapeutic response in short-term clinical trials
78 of chronic Chagas disease [9–12]. Although DNA detection is a helpful tool for the early

79 detection of treatment failure, a negative result does not indicate absence of infection
80 [13].

81 Different protocols based on PCR and real-time PCR procedures were developed for
82 the detection of *T. cruzi* at the chronic stage, with low sensitivity for diagnostic
83 purposes [14], attributed to the course of the chronic phase, with low and intermittent
84 parasitemia [5]. This low sensitivity implies that in clinical trials, where a positive PCR
85 result in the screening phase is mandatory for patient inclusion, a larger number of
86 subjects should be tested.

87 The MULTIBENZ study planned to collect peripheral blood sample from each patient at
88 each follow-up time point (up to 12 months after treatment) and perform DNA extraction
89 in triplicate from each blood sample and a real-time PCR in duplicate from each DNA
90 extract [6].

91 This study aims to evaluate the performance of different extraction replicates to
92 improve the sensitivity of real-time PCR for the detection of *T. cruzi* DNA at baseline
93 and identification of failure after treatment in the cohort of the MULTIBENZ clinical trial.

94

95 **MATERIAL AND METHODS**

96 **Ethics statement**

97 The clinical trial MULTIBENZ (NTC03191162) was approved by the Ethical Review
98 Boards of the all participant centres, according to the principles expressed in the
99 Declaration of Helsinki. Written informed consent forms were signed by the study
100 subjects and all samples were anonymized before being analyzed.

101

102

103 **Patients and samples**

104 Patients were screened in four study sites: Argentina, Brazil, Colombia, and Spain (Fig.
105 1). The inclusion criteria were: adults (≥ 18 years old) diagnosed with chronic CD by two
106 different serological tests that have not been previously treated with BNZ or Nifurtimox,
107 and have a positive real-time PCR result during the screening period [6]. Neither
108 pregnant nor immunocompromised subjects were included. In this work, all patients
109 enrolled in the MULTIBENZ study have been included for analysis, regardless of
110 whether or not they have undergone complete follow-up.



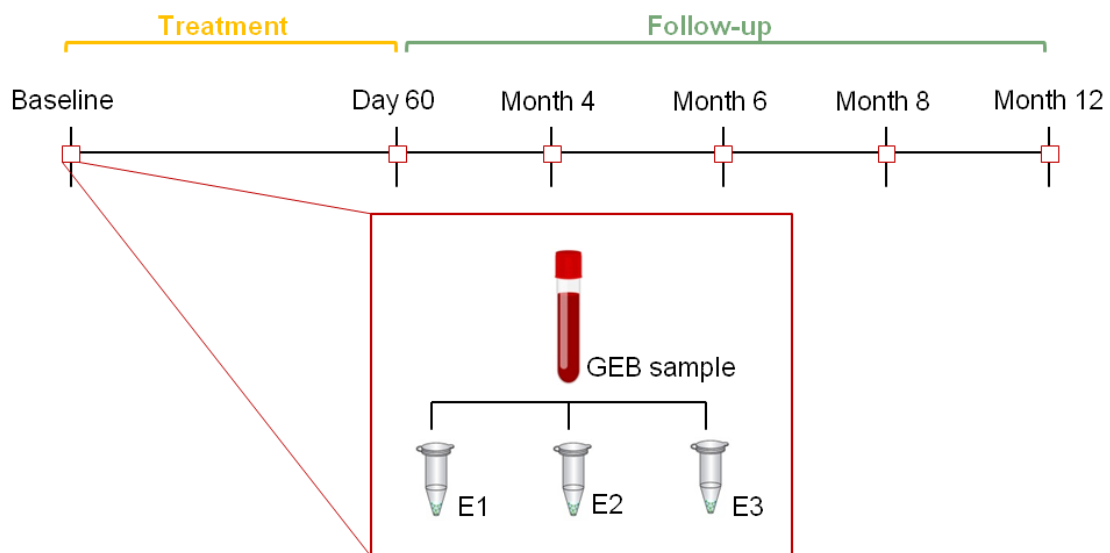
111

112 **Figure 1.** Centers involved in the recruitment of the MULTIBENZ study. In Argentina: Instituto
113 Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben (Buenos Aires) and Instituto de Cardiología
114 Juana Francisca Cabral (Corrientes); in Brazil: Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação
115 Oswaldo Cruz (Belo Horizonte) and Hospital Universitário Clemente de Faria (Montes Claros);
116 in Colombia: Fundación Cardioinfantil – Instituto de Cardiología; and in Spain: University
117 Hospital Vall d’Hebron (Barcelona) and University Hospital Ramón y Cajal (Madrid).

118

119

120 Peripheral blood sample collected at baseline (pre-treatment), at day 60 (end of
121 treatment) and at 4, 6, 8 and 12 months during the follow-up period were analyzed (Fig.
122 2). Five mL of whole blood samples were mixed with an equal volume of Guanidine
123 6M-EDTA 0.2M, pH 8 buffer (GEB, guanidine-EDTA-blood), kept at room temperature
124 for 72 hours and stored at 4°C until its analysis. From each GEB sample, three DNA
125 extraction replicates were obtained, and a real-time PCR was performed in duplicate
126 from each DNA extract. Only patients with at least one positive result at baseline visit
127 were enrolled in the trial. Therapeutic failure was defined as the detection of *T. cruzi*
128 DNA at any time point during post treatment follow-up.



129

130 **Figure 2.** Study schedule and diagram of the samples collected. GEB: guanidine-EDTA-blood;
131 E: extraction replicate.

132

133

134 **DNA extraction procedures**

135 DNA extraction was performed using two different methodologies:

136 - Method A (Argentina, Brazil and Colombia [during recruitment]): High Pure PCR
137 Template Preparation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), based on glass
138 fibre spin columns. The DNA was extracted from 300 µL of GEB and eluted in 100
139 µL of the elution buffer, as previously described [15].

140

141 - Method B (Spain and Colombia [during follow-up visits]): Nuclisense easyMAG
142 (bioMérieux Diagnostics, Marcy-l'Étoile, France), an automated system based on
143 magnetic silica particles. The DNA was extracted from 200 µL of GEB and eluted in
144 55 µL of the elution buffer, as recommended by the manufacturer.

145 In both cases, 200 pg of a linear plasmid was added as an internal amplification control
146 (IAC) [16] at the beginning of each DNA extraction protocol. Eluted DNA were kept at -
147 20°C until real-time PCR analysis.

148 **Real-time PCR procedures**

149 A duplex real-time PCR procedure that targets satellite *T. cruzi* DNA and IAC
150 sequences was used [15]. The real-time PCR was carried out using FastStart Universal
151 Probe Master Mix (Roche Diagnostics) with 5 µL DNA sample, with some modifications
152 regarding the participant centre:

153 -Real-time PCR A (Argentina, Brazil and Colombia [during recruitment]): reactions were
154 performed in a final volume of 20 µL using the ABI Prism 7500 thermocycler (Applied
155 Biosystems, Waltham, MA).

156 -Real-time PCR B (Spain and Colombia [during follow-up visits]): reactions were
157 carried out in a final volume of 25 µL using CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection
158 System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

159 In both cases, the cycling conditions were an initial step of 15 minutes at 95°C,
160 followed by 40 cycles at 95°C for 15 seconds and 58°C for 1 minute.

161 Negative and positive controls were included in every run, as recommended [18]. A
162 GEB sample was considered positive for *T. cruzi* DNA when at least one of six PCR
163 replicates had a positive result.

164 **Statistical analysis**

165 Fisher's exact test was used to compare the cumulative sensitivity of real-time PCR
166 after analysing one, two or three DNA extraction replicates, as well as the cumulative
167 therapeutic failure at the end of follow-up within each treatment group using one, two or
168 three DNA extraction replicates. The SPSS (SPSS Inc, Chicago, IL) software package
169 v22.0 was used for statistical analysis.

170

171 **RESULTS**

172 The total number of patients screened as well as the total number of positives obtained
173 in each participating center during the screening visit is shown in Table 1. The real-time
174 PCR positivity obtained in patients from Argentina (55.35%) and Brazil (60%) is higher
175 than from patients screening in Spain (42.11%, $p<0.05$) and Colombia (29.35%,
176 $p<0.001$).

177 **Table 1.** Number of patients enrolled in the MULTIBENZ study at each center and
 178 country.

Country and centre	Patients screened (N)	No. (%) positive	Total No. (%) positive ^a
Argentina			
Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chaben	67	43/67 (64.18)	88/159 (55.35)
Instituto de Cardiología Juana Francisca Cabral	92	45/92 (48.91)	
Brasil			
Centro de Pesquisas René Rachou – Fundação Oswaldo Cruz	26	22/26 (84.62)	90/150 (60)
Hospital Universitário Clemente de Faria	124	68/124 (54.84)	
Colombia			
Fundación Cardioinfantil – Instituto de Cardiología	92	27 ^b /92 (29.35)	
Spain			
University Hospital Vall d'Hebron	152	64/152 (42.11)	
University Hospital Ramón y Cajal	^c		

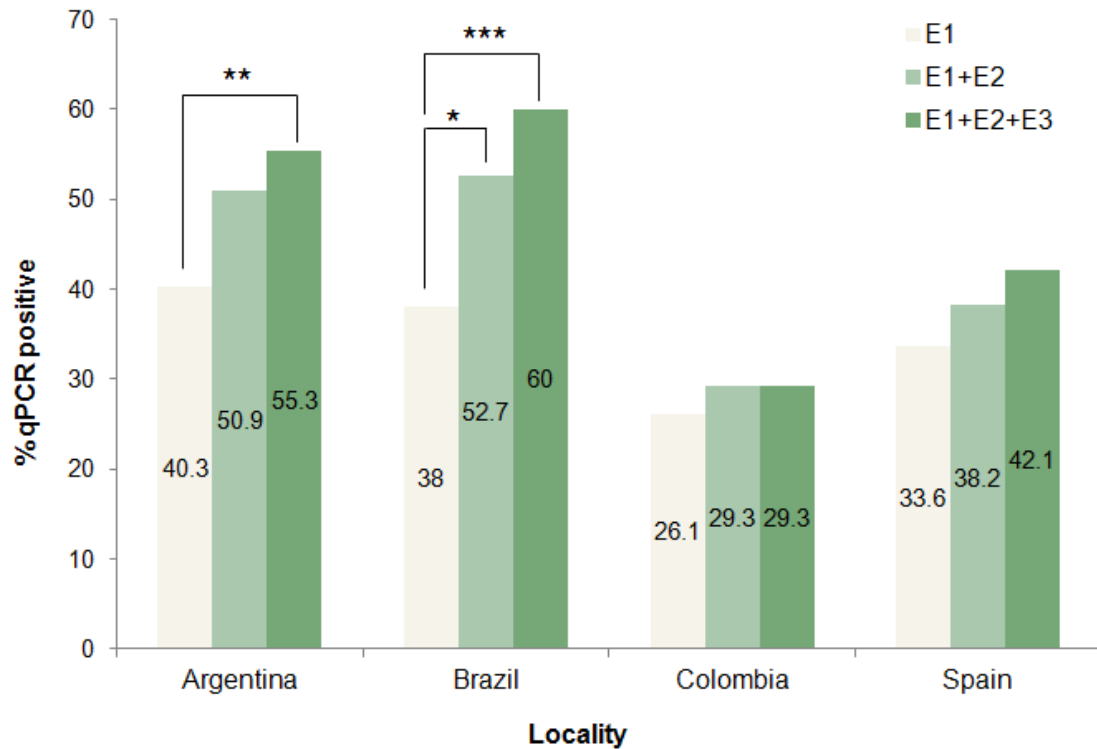
179 ^a Values obtained taking account the three extraction replicates (E1+E2+E3)

180 ^bThese number do not cover the total number of patients recruited in this country, as the
 181 remaining N was completed by inviting participation of PCR-positive patients diagnosed in other
 182 studies (who therefore did not follow the study protocol of three extraction replicates and two
 183 qPCR replicates of each eluate).

184 ^c Unfortunately, we do not have data on the total number of patients recruited by this center, so
 185 the total number of patients recruited in Spain corresponds to those of the University Hospital
 186 Vall d'Hebrón center.

187

188 The comparison between the percentages of positivity when performing a single
 189 extraction replicate (E1) or two replicates (E1+E2) does not show a significant increase
 190 in any country ($p > 0.05$), except in Brazil (38% versus 52.67%, $p < 0.05$) (Fig. 3). The
 191 analysis of the three extractions replicates (E1+E2+E3) versus one replicate (E1)
 192 improved real-time PCR positivity from 40.25% to 55.35% ($p < 0.01$) in Argentina and
 193 from 38% to 60% ($p < 0.001$) in Brazil (Fig. 3).



194

195 **Figure 3.** Real-time PCR positivity in pretreated chronic Chagas disease patients regarding the
 196 number of DNA extraction replicates performed at baseline visit.

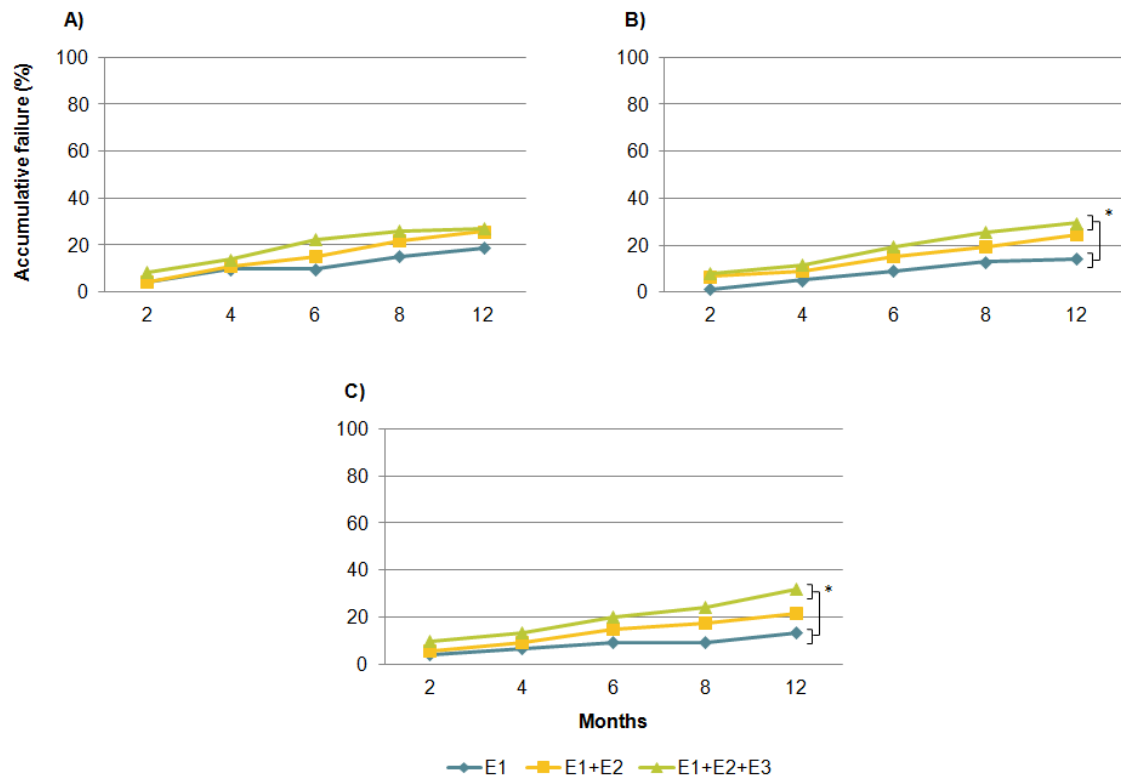
197

198 Figure 4 shows the percentages of real-time PCR positivity as a measure of treatment
 199 failure obtained for each treatment arm (Fig. 4).

200 No significant differences were found comparing the cumulative treatment failure
 201 detected for a single extraction replicate (E1; 18.92, 14.10, and 13.33%) or for two
 202 replicates (E1+E2; 25.68, 24.36, and 21.33%) for standard dose, low-dose, and short-
 203 dose, respectively ($p > 0.05$) (Fig. 4). The differences between cumulative treatment
 204 failure detected were also not significant comparing E1+E2 versus E1+E2+E3 (27.03,
 205 29.49, and 32%) for standard dose, low-dose, and short-dose, respectively ($p > 0.05$)
 206 (Fig. 4).

207 However, conducting three extraction replicates (E1+E2+E3) versus a single extraction
 208 replicate (E1) increased the detection of treatment failure at the end of follow-up to

209 27% for the standard treatment ($p>0.05$) (Figure 2A), 29.5% for the low-dose treatment
 210 ($p<0.05$) (Figure 2B) and 32% for the short treatment ($p<0.05$) (Figure 2C).
 211 Comparison of cumulative therapeutic failure among the different treatment groups did
 212 not show significant differences ($p>0.05$) (Figure 4).



213

214 **Figure 4.** Cumulative therapeutic failure at the different follow-up points of each treatment
 215 groups. (A) Standard BNZ dose; (B) Low-dose; (C) Short-dose. E1, E2, E3: extraction
 216 replicates. *, $p<0.05$.

217

218

219

220 **DISCUSSION**

221 *T. cruzi* DNA detection has been increasingly used as surrogate biomarker for
222 treatment response monitoring in clinical trials of chronic CD. Several clinical trials of
223 chronic CD have used different strategies and methodologies to increase real-time
224 PCR sensitivity to detect treatment failure [9,11,12,19,20], with varying results of
225 sensitivity. Therefore, the development of new strategies to detect *T. cruzi* DNA will
226 impact directly on the evaluation of new antiparasitic treatments. The present work
227 analyzes whether performing more than one DNA extraction replicate influences on
228 real-time PCR positivity for the diagnosis and follow-up of patients with chronic CD,
229 using the cohort of the MULTIBENZ clinical trial.

230 This study shows that the sensitivity of the final result is influenced by the number of
231 extraction replicates. In particular, real-time PCR positivity was significantly improved at
232 baseline in Argentina and Brazil when three DNA extraction replicates were analyzed.
233 However, the addition of the second DNA extraction gave a small but non-statistically
234 significant improvement in real-time PCR positivity in all localities, except in Brazil,
235 where this difference was significant. This increase in the sensitivity is useful to
236 enhance the capacity to recruit chronic CD patients for clinical trials, in which the
237 inclusion criteria require at least one real-time PCR-positive result at screening phase.

238 Moreover, in both treatment arms to be analyzed (low- and short-dose), the
239 performance of three extraction replicates significantly increases the detection of
240 treatment failure. This improved sensitivity for detecting treatment failures is of
241 particular relevance in the context of clinical trials, where the aim is to have a method
242 with a high sensitivity for use in post-treatment follow-up to determine treatment
243 efficacy.

244 The study of Parrado, et al. demonstrated that collected serial blood samples and
245 qPCR replicate analysis improved the final positive results obtained [20]. In addition,

246 the strategy of analyzing three DNA extraction replicates from one single blood sample
247 implemented in this work, showed a similar impact on qPCR sensitivity (an increase of
248 about 5% of positive cases) that the one used by Parrado, et al. [20], who collected and
249 assayed three serial blood samples per patient at each time-point visit.

250 The blood sample volume is an important factor to be considered in chronic patients
251 with low levels of parasitaemia following treatment [13]. Therefore, this study supports
252 the use of DNA extraction replicates instead of collecting several blood samples,
253 reducing the volume of blood needed for real-time PCR testing purposes in clinical
254 trials of chronic CD. It would be necessary to evaluate the use of these different options
255 in different scenarios, according to available resources.

256 To conclude, this study supports the utility of performing replicate DNA extraction to
257 increase the proportion of real-time PCR-positive samples for both recruitment of
258 chronic CD patients into clinical trials and detection of therapeutic failure in this
259 population.

260

261 **REFERENCES**

- 262 1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2020.
263 Available: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
264 [\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- 265 2. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease: Estimates and
266 Challenges. *Glob Heart*. 2015;10: 139–144. doi:10.1016/j.gheart.2015.06.001
- 267 3. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something
268 known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.
269 *Acta Trop*. 2018;184: 38–52. doi:10.1016/j.actatropica.2017.09.017
- 270 4. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG,
271 et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale,
272 epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*.
273 2012;12: 240–253. doi:10.1016/j.meegid.2011.12.009
- 274 5. Pérez-Molina J, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391: 82–94.
275 doi:[http://dx.doi.org/10.1016/ S0140-6736\(17\)31612-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)
- 276 6. Molina-Morant D, Fernández ML, Bosch-Nicolau P, Sulleiro E, Bangher M,
277 Salvador F, et al. Efficacy and safety assessment of different dosage of
278 benznidazol for the treatment of Chagas disease in chronic phase in adults
279 (MULTIBENZ study): Study protocol for a multicenter randomized Phase II non-
280 inferiority clinical trial. *Trials*. 2020;21: 1–10. doi:10.1186/s13063-020-4226-2
- 281 7. Sales PA, Molina I, Murta SMF, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-
282 Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A
283 review. *Am J Trop Med Hyg*. 2017;97: 1289–1303. doi:10.4269/ajtmh.16-0761
- 284 8. Gomes YM, Lorena V, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has
285 been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up
286 studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104: 115–121.
- 287 9. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al.
288 Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas'
289 Disease. *N Engl J Med*. 2014;370: 1899–1908. doi:10.1056/nejmoa1313122
- 290 10. Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, et al.
291 Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a
292 systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12: 479–496.
293 doi:10.1586/14787210.2014.899150
- 294 11. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi
295 R, et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in
296 Asymptomatic *T. cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol*.
297 2017;69: 939–947. doi:10.1016/j.jacc.2016.12.023
- 298 12. Torrico F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-vega C, Pinazo M, Schijman A, et al.
299 Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and
300 three E1224 dosing regimens : a proof-of-concept , randomised , placebo-
301 controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018;3099. doi:10.1016/S1473-
302 3099(17)30538-8
- 303 13. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas
304 disease chemotherapy: Value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*.

- 305 2009;104: 122–135. doi:10.1590/S0074-02762009000900018
- 306 14. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*. 2018;184:
307 59–66. doi:10.1016/j.actatropica.2018.02.019
- 308 15. Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, et al. Analytical
309 Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for
310 Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. *PLoS Negl*
311 *Trop Dis*. 2013;7: e2000. doi:10.1371/journal.pntd.0002000
- 312 16. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate Real-
313 Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas
314 Disease Patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3: e419.
315 doi:10.1371/journal.pntd.0000419
- 316 17. Burd EM. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious
317 diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23: 550–576. doi:10.1128/CMR.00074-09
- 318 18. da Cruz Moreira O, Ramirez JC. Genotyping of *trypanosoma cruzi* from clinical
319 samples by multilocus conventional PCR. *Methods in Molecular Biology*. 2019.
320 pp. 227–238. doi:10.1007/978-1-4939-9148-8_17
- 321 19. Wei B, Chen L, Kibukawa M, Kang J, Waskin H, Marton M. Development of a
322 PCR Assay to Detect Low Level *Trypanosoma cruzi* in Blood Specimens
323 Collected with PAXgene Blood DNA Tubes for Clinical Trials Treating Chagas
324 Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10: 1–15. doi:10.1371/journal.pntd.0005146
- 325 20. Parrado R, Ramirez JC, de la Barra A, Alonso-Vega C, Juiz N, Ortiz L, et al.
326 Usefulness of serial blood sampling and PCR replicates for treatment monitoring
327 of patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*.
328 2019;63: 1–12. doi:10.1128/AAC.01191-18
- 329

Trabajo 4. Cribado comunitario oportunista de la enfermedad de Chagas crónica mediante una prueba de diagnóstico rápido en farmacias de Barcelona (Cataluña, España): protocolo de estudio y resultados de la fase piloto.

Título original: *Opportunistic community screening of chronic Chagas disease using a rapid diagnosis test in pharmacies in Barcelona (Catalonia, Spain): study protocol and pilot phase results.*

Autores: Silgado A, Bosch-Nicolau P, Sanchez-Montalvá A, Cervià A, Gomez-i-Prat J, Bagaria G, Rodriguez C, Goterris L, Serre-Delcor N, Oliveira-Souto I, Salvador F, Molina I, Sulleiro E.

Resumen

Objetivo: Describir el protocolo y los resultados de la fase piloto de un programa de cribado oportunista de la EC basado en farmacias comunitarias en Barcelona, España.

Material y métodos: Se diseñaron tres estrategias de cribado según el enfoque de reclutamiento en la farmacia: pasiva, activa y activa-comunitaria. El protocolo del estudio incluyó la firma del consentimiento informado de la persona interesada, el registro de los datos epidemiológicos y clínicos en un sistema de base de datos web, la realización de la prueba rápida (*Trypanosoma Detect*TM) y la recogida de sangre en papel seco. El resultado de la PDR se informó en el acto y en el caso de resultar positiva se convenía una cita para una posterior visita en la unidad de referencia. Tras la fase piloto, se realizó un análisis DAFO.

Resultados: Durante la fase piloto del estudio participaron un total de 19 farmacias y se incluyeron 64 personas que cumplían los criterios de inclusión. La PDR fue positiva en 2/64 (3,13%) casos. Respecto a las muestras de DBS, 13/49 (26,53%) fueron recogidas de forma incorrecta, por lo que no pudieron ser procesadas. De las 36 muestras de DBS que sí pudieron analizarse, 26/36 (72,22%) fueron negativas por E-CLIA, 1/36 (2,8%) fue positiva, mientras que las restantes fueron inválidas (9/36; 25%). Tras la evaluación cuantitativa y cualitativa del programa, se descartó la muestra de papel seco al complicar la toma de muestra al farmacéutico, además de la eliminación de la estrategia pasiva, ya que fue la que menor porcentaje de reclutamiento presentó (13/64; 20,31%).

Conclusiones: La realización de la toma de muestra de DBS y la estrategia pasiva no son adecuadas para el cribado de la EC en las farmacias comunitarias. Es necesario ampliar el número de farmacias y personas participantes para determinar si la realización de una PDR en las farmacias comunitarias es un método de cribado eficaz para incrementar el acceso al diagnóstico de la EC en una zona no endémica.

1 **Title:** Opportunistic community screening of chronic Chagas disease using a rapid
2 diagnosis test in pharmacies in Barcelona (Catalonia, Spain): study protocol and pilot
3 phase results

4 **Running head:** Chagas disease community screening in pharmacies in Barcelona

5 Aroa Silgado¹, Pau Bosch-Nicolau^{2,3}, Adrian Sanchez-Montalvá^{2,3*}, Ariadna Cervià⁴,
6 Jordi Gomez-i-Prat², Guillermo Bagaria⁴, Cristina Rodriguez⁴, Lidia Goterris¹, Núria
7 Serre-Delcor^{2,3}, Inés Oliveira-Souto^{2,3}, Fernando Salvador^{2,3}, Israel Molina^{2,3&}, Elena
8 Sulleiro^{1,3&} on behalf of the CHAGAS-FARMACIA study group^{3,^}.

9 Affiliations:

10 ¹Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma
11 de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

12 ²Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat
13 Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Spain

14 ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Infecciosas
15 (CIBERINFEC), Instituto de Salud Carlos III, Spain

16 ⁴Official College of Pharmacists of Barcelona, Barcelona, Spain

17 [&]These authors contributed equally as co-seniors.

18 *Corresponding author:

19 Adrián Sánchez-Montalvá, PhD.

20 E-mail address: adsanchez@vhebron.net

21

22 [^]Membership of the CHAGAS-FARMACIA study group is provided in the
23 Acknowledgments.

24

25

26

27 **Abstract**

28 Chagas disease (CD) epidemiology has changed over the last decades, spreading to
29 non-endemic areas due to populations movements from Latin America. In non-endemic
30 areas people with CD are underdiagnosed, being barrier to access the health system
31 and stigma some of the most important. In this context, community interventions can
32 reach susceptible population increasing diagnosis coverage of people with CD.
33 Community pharmacies (CPs) are essential stakeholders in the national health system
34 network and have a variety of characteristics that make them suitable for screening
35 programs. A screening program in CP may be able to mitigate the access barriers
36 affecting people with CD. This study aimed to report the protocol and results from the
37 pilot phase of an opportunistic CP-based CD screening program in Barcelona, Spain.
38 For it, three strategies according to recruitment approach were designed: passive,
39 active and active-community. The study process consisted of signing the informed
40 consent form, recording the patient's data in a web-based database system, and
41 performing the rapid test and blood collection on dry paper. A total of 19 pharmacies
42 participated and 64 patients were included during the pilot phase of the study. The
43 rapid diagnostic test (RDT) was positive in 2/64 (3.13%) cases. Of the 49 DBS samples
44 that arrived at the laboratory, 22 (45%) were collected incorrectly. After quantitative and
45 qualitative assessment of the program, the dry paper sample and passive strategy
46 were ruled out. DBS sampling and the passive strategy are not suitable for CD
47 screening in community pharmacies. More participating pharmacies and individuals are
48 needed to determine whether conducting a PDR in community pharmacies is an
49 effective screening method to increase access to CD diagnosis in a non-endemic area.

50

51

52 **Author summary**

53 Chagas disease is a potentially life-threatening illness and has a high index of
54 underdiagnosis, mainly due to barriers to access to the health system and stigma.
55 Community screening activities allow us to reach the population at risk, so this project
56 aimed to increase CD diagnosis using an existing health system resource. To the best
57 of our knowledge, there is no screening program for Chagas disease carried out in
58 community pharmacies.

59 This program brings a new approach to facilitate the access of patients living with
60 Chagas disease to rapid screening tests through community pharmacies, increasing
61 the number of patients receiving care in tropical medicine units. Opportunistic
62 screening in community pharmacies may mitigate health system barriers for at-risk
63 population.

64

65

66

67

68

69

70

71

72

73

74 Introduction

75 Chagas disease (CD), a life-threatening disease caused by the protozoan
76 *Trypanosoma cruzi*, affects between 6 and 7 million people worldwide (1). It is
77 estimated that nearly 10,000 deaths per year are directly caused by CD, with an
78 estimated global cost of 8 billion dollars per year in lost productivity and health costs
79 (2). Although endemic in Latin America, the number of CD cases reported in non-
80 endemic countries has increased due to population movements (3). In Europe, Spain
81 has the highest number of people infected by *T. cruzi*, with an estimated 52,000 cases;
82 however, approximately 70% remain undiagnosed (4).

83 In the absence of the vector, CD can be transmitted via vertical transmission, blood
84 transfusion and organ transplantation (5). Accordingly, health authorities in Spain have
85 implemented different measures to control CD transmission: screening in blood banks
86 is mandatory (Royal Decree 1088/2005) and some Spanish regions established CD
87 screening protocols in pregnant women from Latin America, such as Valencia (6),
88 Galicia (7) and Catalonia (8). However, no screening program to control CD in the
89 general Latin American population is implemented in Spain and CD diagnosis relies on
90 the general physician's decision. Unfortunately, time constraints and the healthcare
91 workers' poor knowledge of CD, inefficiencies in the diagnosis and referral process
92 flows, together with barriers to health system access and stigmatization, limit the
93 current strategy to diagnose people with CD (9). To overcome these barriers,
94 community-based activities for screening and case detection allow us to identify at-risk
95 individuals and thus limit potential associated complications through early detection
96 and appropriate treatment (10).

97 The vast majority of CD patients living in non-endemic areas are in the chronic stage of
98 the disease (11). Diagnosis of this phase is by means of serological tests (12); for
99 mass-screening surveys, a rapid, sensitive and easy to perform and interpret point of

100 care diagnostic test would be valuable (13). Rapid diagnostic tests (RDTs) to detect
101 antibodies against *T. cruzi* have been developed (14). Additionally, Dried Blood Spots
102 (DBS) from finger-prick blood can be safely collected, stored at room temperature and
103 sent under conventional courier conditions (15).

104 Community pharmacies (CPs) are a private healthcare resource that work in an
105 integrated and coordinated manner in the management of health processes of the
106 population. CPs are valuable assets for screening strategies due to territorial balance,
107 consumer confidence, capillarity and social cohesion, professionalism and qualification,
108 and their dense and interconnected network (16). Previous screening initiatives
109 involving CPs have been carried out in Spain for other pathologies, such as
110 opportunistic, under request, HIV screening programs and systematic colorectal cancer
111 screening programs, with positive results (17,18). To our knowledge, no CD screening
112 program has been carried out in community pharmacies.

113 This study aimed to describe the protocol and results from the pilot phase of an
114 opportunistic CD screening program at CPs in Barcelona (Catalonia, Spain).

115

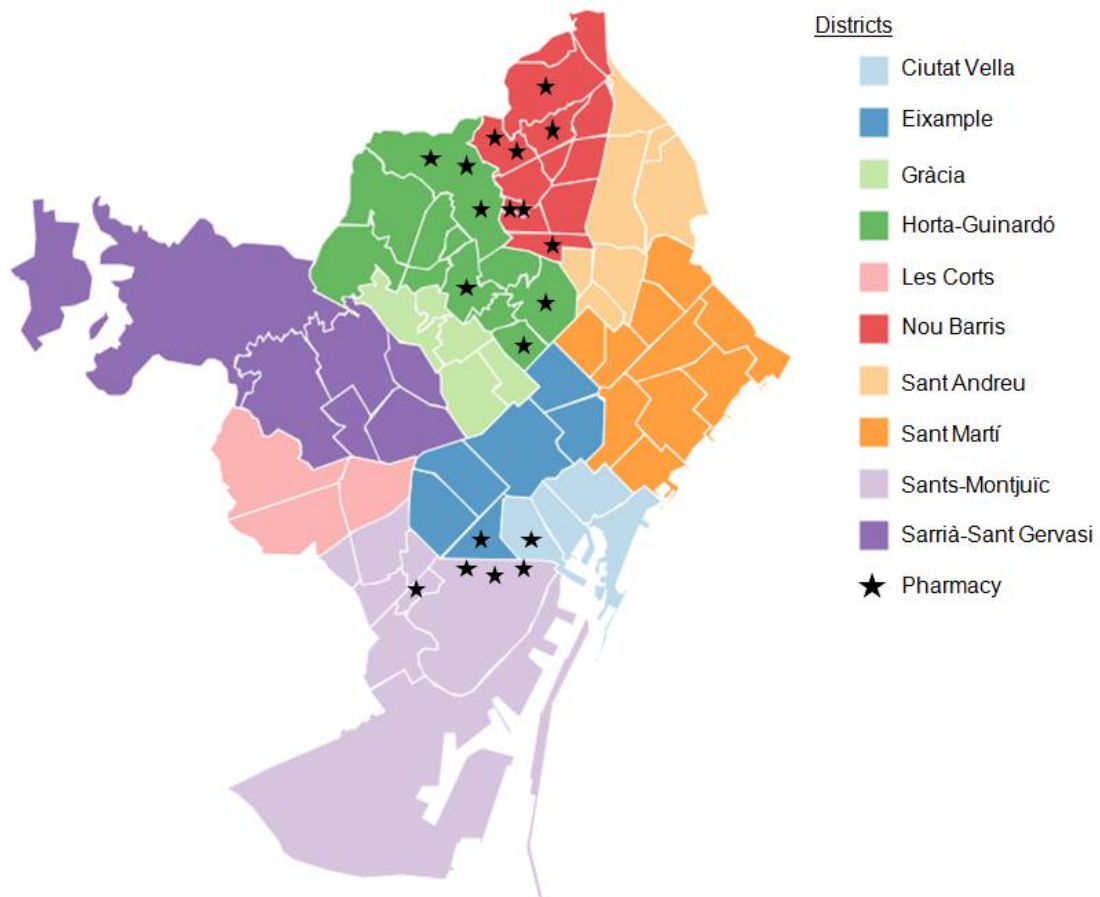
116 **Material and methods**

117 **Stakeholders, target population and study design**

118 This was an opportunistic CD screening intervention performed in CPs for people aged
119 18 or over, who had lived for more than one month in an area endemic for CD. This
120 project was financed by the Fundació Marató TV3 (project number 20182610) and
121 supported by different referent organizations: College of Pharmacists of Barcelona, Vall
122 d'Hebron University Hospital (HUVH), International Health Program of the Catalan
123 Health Institute and XarChagas program. The pilot phase was performed from
124 November 2019 to May 2021, at which time the strengths, weaknesses, opportunities,

125 and threats (SWOT) analysis and relevant modifications to the final study protocol were
126 made.

127 The screening study was carried out in three districts of Barcelona city (Fig 1) with a
128 large population of Latin American migrants, according to the data of the last census in
129 Barcelona (19): Nou Barris, Sants-Montjuïc and Horta-Guinardó. Participating
130 pharmacies (N=19) were selected based on different factors, including proactivity,
131 experience in other screening programs (HIV and/or colorectal cancer), biological
132 waste management training and certification, commitment to data protection
133 procedures and facilities that ensure a comfortable and safe participant experience.



134

135 **Fig 1.** Distribution of the 19 pharmacies that participated in the pilot phase in the city of
136 Barcelona. Modified from: <https://www.instamaps.cat/>

137

138 **Opportunistic screening strategies**

139 Three different strategies were used to approach the target population: (i) passive, (ii)
 140 active and (iii) active-community actions (Table 1). All participating CPs displayed
 141 posters offering CD screening at the entrance of the pharmacy, easily visible from the
 142 outside. In addition, informative leaflets were placed on the counter of the CP. Both
 143 posters and leaflets informed that the participant had the opportunity to take a free,
 144 rapid CD screening test. In addition, the leaflets contained basic information about CD
 145 and reasons to be screened. Iconographic material was specially designed with the
 146 help of people affected with CD using a consensus decision-making process with the
 147 aim of drawing the attention of the Latin American population (S1 Fig.).

148 **Table 1.** Characteristics of the three strategies presented in the CD screening program.

	Passive	Active	Active-community
Informative leaflets	√ ^a	√	√
Posters	√	√	√
Pharmacist offers rapid diagnosis tests	× ^b	√	√
Involvement of community agents	×	×	√

^a included in the strategy

^b not included in the strategy

149

150 i) Passive: implemented in Nou Barris, pharmacists had a wait-and-see attitude to
 151 recruit the target population; in this case the participant would request the RDT. ii)
 152 Active: implemented in Horta-Guinardó, pharmacists had a proactive attitude, where
 153 they explained and offered the RDT to Latin American consumers. iii) Active-
 154 community: implemented in those pharmacies located in the Sants-Montjuïc district.
 155 The iconographic material and the active attitude of the pharmacist were supplemented
 156 by the participation of community agents, who were tasked with conducting
 157 workshops/informative sessions in Latin American cultural associations and social
 158 meetings to encourage participation.

159 **Pharmacist training**

160 Pharmacists received training in CD and RDT performance by completing a 3 h course
161 imparted by physicians, microbiologists and community agents. This course explained
162 general aspects of CD (including epidemiology, diagnosis and treatment); how to use
163 and interpret the RDT; how to collect DBS samples; the use of the information system
164 tools; as well as how to approach the participant. In this sense, an “Expert Patient”
165 (Latin American community worker) trained the pharmacist in techniques to identify and
166 approach Latin American consumers (S2 Fig.).

167 Participating pharmacies were invited to complete a brief anonymous survey with
168 general questions about CD before and after the training. This survey consisted of 18
169 questions divided into four specific areas (epidemiology, transmission, clinical
170 presentation and diagnosis/treatment). Moreover, another brief anonymous satisfaction
171 survey was performed to evaluate the training course.

172 **Monitoring plan**

173 During the study, pharmacies received a personal visit from the training personnel
174 (including a physician, a microbiologist, and a community health agent) to review the
175 process, answer questions and correct any protocol deviations. To this end, a
176 monitoring system was developed that included a guide for visiting and monitoring
177 pharmacies (Standard Operational Procedure Monitoring Guideline) (Table 2). In
178 addition to the on-site monitoring, pharmacies, lying in the last quartile according to the
179 number of patients recruited, were telephoned and interviewed by an investigator
180 regarding the hurdles hindering project implementation.

181 **Dissemination and communication**

182 Different collaborating entities were contacted to inform them of the implementation of
183 the screening program, such as the health centers in the selected neighborhoods, the

184 department of health of the Government of Catalonia, and different community
 185 organizations.

186 During the project, online stakeholder meetings were scheduled every three months or
 187 sooner under request from any stakeholder. A mailing list and a group in an instant
 188 message app were created for rapid communication.

189 **Table 2.** Description of the standard operating procedure for visiting and monitoring in
 190 pharmacies.

Item	Description
Iconographic material	Check the placement of the poster in a place visible from the outside.
	Check the presence of the leaflets in a visible place at the counter or elsewhere in the pharmacy.
Interaction with participants and informed consent form	Remember inclusion criteria.
	Resolve doubts about the approach, interaction, etc.
Rapid test and dried blood spot	Remind of the importance of sign informed consent form.
	Checking of materials and consumables.
	Review waste management.
	Review the execution and reading of the rapid test.
Data collection	Review the dried blood sample collection process.
	Check access to the database platform web.
Processes	Review database handling.
	Review referral processes for patients with a positive PDR result.
	Review the information to be provided in the case of patients with a negative RDT result.
	Review the management processes for blood samples collected on filter paper.

192 **Information system tools and database**

193 A web-based database platform was designed to record patient information, results
194 obtained from the RDT and analysis of the DBS samples. This platform had personal
195 authentication, search function, user privilege management and remote control.

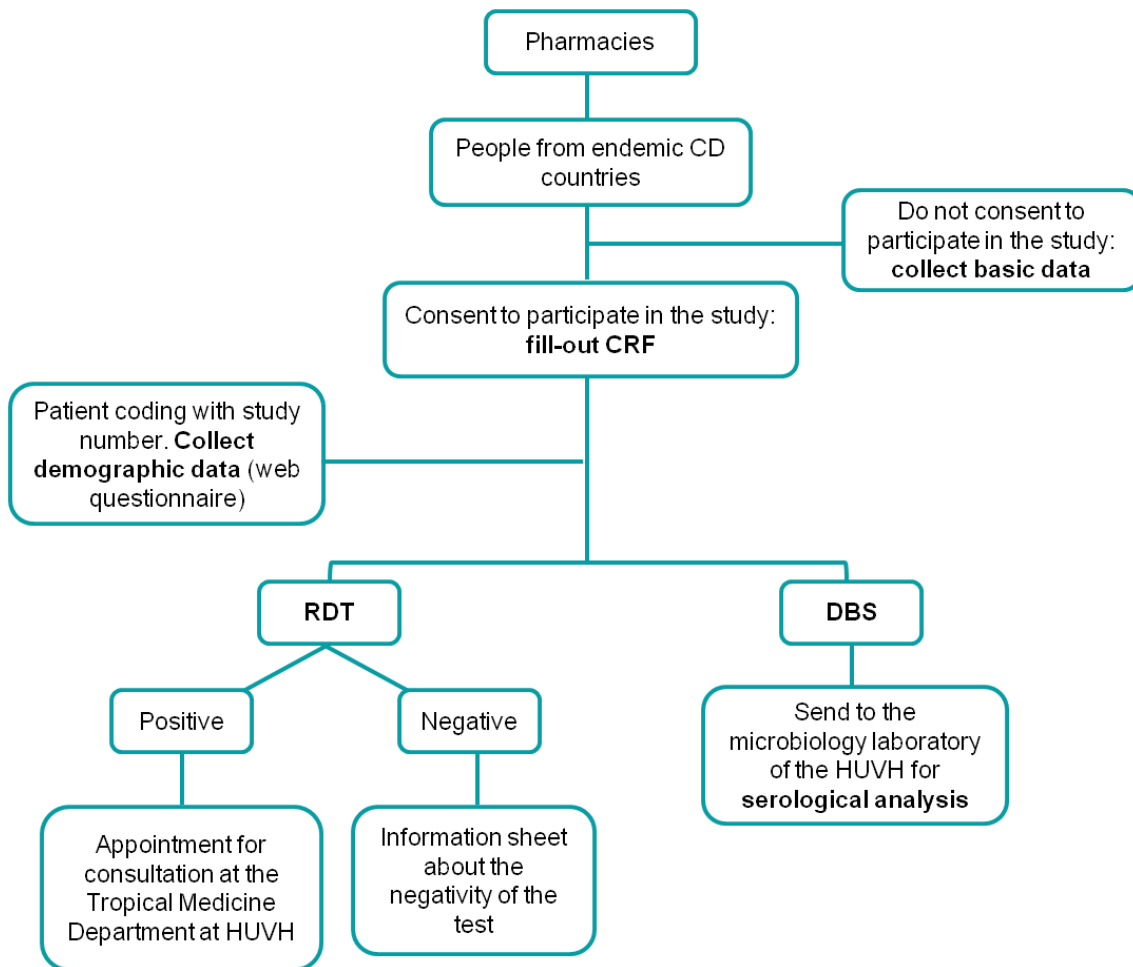
196 The Official College of Pharmacists Information System centralized all information
197 related to the processing and tracing of the RDT kits and DBS samples of the
198 pharmacies and the microbiology laboratory of the HUVH.

199 **Study procedures**

200 **Screening methods**

201 The pharmacist's role, regardless of the strategy, was to check exclusion/inclusion
202 criteria, inform about the importance of screening for CD, and explain the project's
203 objective, procedure, possible results and referral interventions. If the participant
204 agreed, he/she signed two copies of the informed consent form; one copy is kept in the
205 investigator file in the CP and the other is given to the participant. Later, the participant
206 answered a short survey about sociodemographic characteristics and CD risk factors,
207 relatives with the disease and previous testing history. Then, the RDT is performed
208 using a blood drop from a finger-prick. All the procedures were free of charge for the
209 patient. In addition to the rapid test, DBS samples were obtained from finger-prick
210 blood on filter-paper cards.

211 When the RDT result was negative, a specific information sheet was given to the
212 participant. Additionally, he/she was informed, using plain language, of the test's yield,
213 including sensitivity and specificity, and was advised to consult their primary healthcare
214 physician for the corresponding analyses. On the other hand, if the RDT was positive,
215 pharmacists informed the patient about the need for a confirmatory test in a referral
216 hospital. Upon acceptance, the pharmacist could, at that time, schedule an
217 appointment at the HUVH Tropical Medicine Unit for the participant (Fig 2).



218

219 **Fig 2.** Flow diagram depicting the testing algorithm performed at the pharmacy. CRF: case
 220 report form; RDT: Rapid Diagnostic Test; DBS: Dried Blood Spot; HUVH: Vall d'Hebron
 221 University Hospital.

222 **Laboratory procedures (RDT and DBS serology)**

223 A previous analytical study was carried out to determine the sensitivity and specificity
 224 of the chosen rapid test, as well as for the analysis of the DBS samples via a
 225 serological technique (20).

226 The Trypanosoma Detect™ Rapid Test (InBios International, Inc., Seattle, WA) was
 227 selected for the rapid test in community pharmacies and performed according to
 228 manufacturer's instructions. Briefly, one finger-prick blood drop is added to the test strip
 229 in the absorbent area, and then three or four drops of buffer solution are added to the
 230 same area. The results are read after 10 minutes.

231 Regarding DBS samples, between two or three additional drops of blood from the
232 same finger-prick were used to fill one 8-mm-diameter circle on Whatman filter paper
233 card (Whatman 903™ Specimen Collection Paper; GE Healthcare Ltd, Cardiff, United
234 Kingdom). This procedure was repeated to fill a minimum of two circles. If the first
235 finger-prick was not enough to fill the two required circles, the participant was asked
236 about the possibility of making a second finger-prick.

237 Paper cards were dried at room temperature and then placed in a plastic bag with an
238 anti-humidity sachet. All DBS samples were labeled with a code generated at the time
239 of patient data entry to ensure sample traceability. In accordance with the
240 pharmaceutical distribution system, DBS samples were delivered monthly to the
241 microbiology laboratory of the HUVH for serological analysis.

242 DBSs were processed for analysis with the Elecsys Chagas assay (Roche Diagnostics,
243 Mannheim, Germany) for the determination of anti-*T. cruzi* immunoglobulin G.

244 **Community survey**

245 During March and July 2021, a survey of the target population was carried out to
246 provide information regarding the acceptance of CD screening in CPs. This survey was
247 conducted in the Sants-Montjuïc district, coinciding with the involvement of community
248 agents in the project's active strategy. Participants were asked whether they would
249 want to be diagnosed for CD in pharmacies and to find out the reasons if not. Oral
250 consent was requested before beginning the survey. No personal data was recorded
251 for this study.

252 **Ethics**

253 This CD screening program follows the Public Health laws and the Organic Law on
254 Data Protection. Review Board approvals were obtained from the Ethics Committee
255 of the Vall d'Hebron Research Institute (PR(AG)230/2018), according to the principles

256 expressed in the Declaration of Helsinki. Informed consent was obtained from all the
257 participants prior to performance of the RDT. Patients were not involved in developing
258 the research question, design or implementation of this analysis.

259 **Statistical analysis**

260 Qualitative variables were expressed as absolute frequencies and percentages.
261 Categorical variables were described as mean or median and standard deviation or
262 interquartile range according to normal distribution. Statistical analyses were done
263 using SPSS Statistics v22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

264

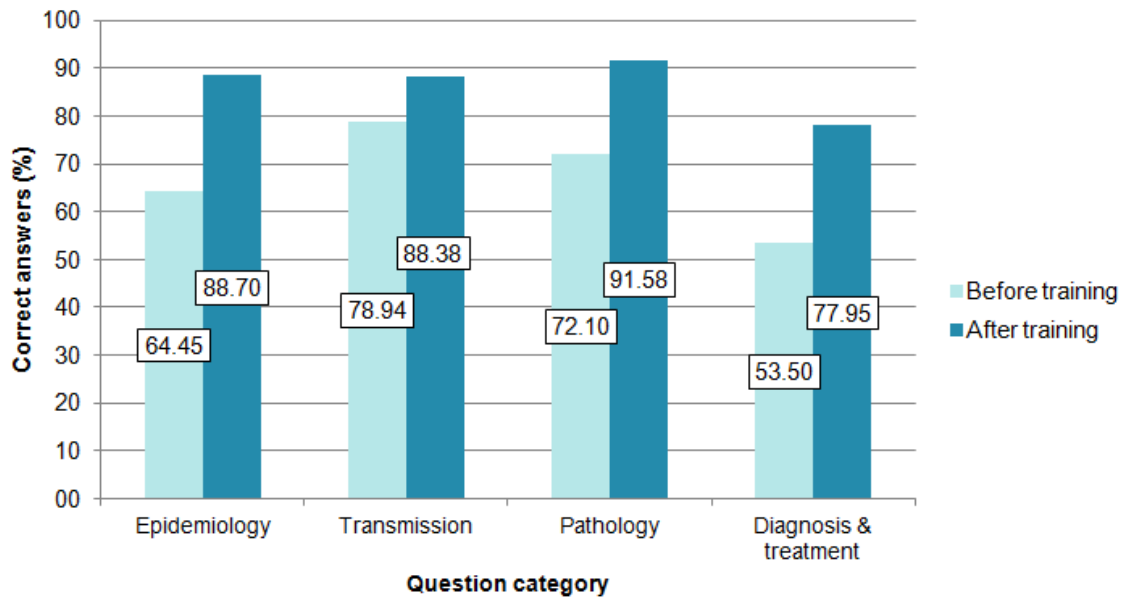
265 **Results**

266 **Pharmacist's training**

267 Thirty-eight pharmacists attended the training course and completed the knowledge
268 survey before and after receiving the training. All question categories showed an
269 increase in the number of correct answers after having completed the course (Fig 3).

270 The satisfaction survey completed by the participating pharmacists included aspects
271 related to organization, training activity, teaching staff and overall evaluation. The
272 scoring scale ranged from 1 to 4 (4 being very positive). The specific aspects and
273 overall median were between 3 and 4 (data not shown).

274



275

276 **Fig 3.** Percentage of correct answers by category before and after the training course. The
 277 questions were grouped into category: questions 1 and 2 on epidemiology, questions 3 to 7 on
 278 transmission, questions 8 to 12 on pathology, and questions 13 to 18 on diagnosis and
 279 treatment.

280 Results from the pilot phase and SWOT assessment

281 In the pilot phase of the study, a total of 19 pharmacies were included: seven for the
 282 passive strategy, six for the active strategy and six for the active-community strategy. A
 283 total of 64 patients were included, of which 46 (71.88%) were women, and the median
 284 age was 40 years (Inter Quartile Range, 32.75-53). The main countries of origin of the
 285 participants were Bolivia (18/64; 28.13%), Ecuador (16/64; 25%) and Peru (12/64;
 286 18.75%). Participants entered the program via communication from pharmacy staff
 287 (29/64; 45.31%), observation of the material in the pharmacy (27/64; 42.19%) and, to a
 288 lesser extent, through an acquaintance or family member (2/64; 3.13%) or information
 289 from community agents (1/64; 1.56%). In five cases (7.81%) this information was not
 290 registered. The RDT was positive in 2/64 (3.13%) cases. The characteristics of these
 291 two cases are resumed in the table 3.

292

293 **Table 3.** Characteristics of the two patients with a positive RDT result.

	Patient code	
	1	6
Country of origin	Bolivia	Uruguay
Age	43	54
Gender	Female	Male
Serology by DBS	Reactive	Non-Reactive
Conventional serology	Positive	Negative

294

295 Of the 64 patients included, a DBS sample was collected in 49 (76.56%) cases.
 296 Thirteen samples (13/49; 26.53%) were inadequately collected and could not be
 297 processed. Of the remaining 36 DBS samples processed for serological analysis, 26/36
 298 (72.22%) were negative, 1/36 (2.78%) was positive and 9/36 (25%) were classified as
 299 invalid, which means that a reading error was obtained in the technique.

300 Due to the low number of patients recruited, a qualitative study of the acceptance of the
 301 project by potential participants was performed in a Latin American population recruited
 302 from public places, such as the Bolivian consulate. Of the 94 people surveyed, 27/94
 303 (28.72%) answered that they considered a community pharmacy a suitable facility for
 304 CD diagnosis, while 28/94 (29.78%) preferred to be diagnosed in healthcare centers.
 305 However, the majority of participants (39/94; 41.49%) answered that they did not want
 306 to be tested for CD.

307 After completion of the pilot experience, a SWOT analysis was applied to improve
 308 aspects of the project (Fig 4).



Fig 4. Strengths, weaknesses, opportunities, and threats (SWOT) analysis of the pilot study. CD: Chagas disease.

310 Discussion

311 The under-diagnosis of people infected by *T. cruzi* responds to a complex matrix of
312 interrelated factors, mainly attributed to the lack of knowledge of the infection and its
313 transmission, fear and stigma, and a long asymptomatic phase (10). These factors
314 complicate access to a diagnosis and, consequently, to treatment and clinical follow-up
315 care (10). *In situ* screening interventions facilitate access to diagnostic tests and
316 increase accessibility to potentially CD-affected people (21).

317 In the knowledge survey conducted on pharmacists before the course, the categories
318 of 'diagnosis and treatment' and 'epidemiology' had the lowest percentage of correct
319 answers. The work of Iglesias-Rus et al., (9) concluded that many physicians outside
320 endemic areas have limited or no knowledge about CD and its implications. It is
321 important to emphasize these aspects since, although the vector is not present in
322 Spain, there are other routes of transmission that are particularly relevant for the
323 transmission of CD in non-endemic areas, especially congenital transmission and via
324 organ transplants and blood products (5).

325 A poor understanding of CD is one of the most important barriers to screening people
326 susceptible to *T. cruzi* infection, especially a lack of accurate information about the
327 disease, including the myth that CD is a synonym for death (22). Moreover, CD
328 diagnosis produces a range of reactions in individuals, from skepticism to fear or
329 anxiety (23). Therefore, a careful approach must be made when offering opportunistic
330 screening to Latin American participants. To this end, our project included the
331 collaboration of a CD "expert patient" with first-hand experience in the disease, who
332 helped design the participant-centered approach and management plan, as well as the
333 communication and dissemination plan (21,24). Pharmacists were trained in the
334 misconceptions and fears associated with CD. When dealing with the at-risk
335 population, pharmacists are recommended to communicate using clear language,

336 without stereotypes and with scientific rigor. Likewise, they must respect the views and
337 knowledge of the participants. To this end, the figure of the “expert patient”, as well as
338 iconographic materials, were essential for the implementation of this program. The
339 involvement of community agents was intended to reduce the reluctance to participate
340 and increase community engagement with the project. Therefore, their participation
341 was aimed at eliminating the social stigma surrounding CD.

342 The SWOT analysis of the pilot phase highlighted several strengths of this program,
343 such as coordination by experienced staff and training of pharmacists, as well as the
344 free testing offered. However, several challenges were identified, including the
345 reluctance to know their CD status and the lack of acceptance of positive RDT results.

346 The study was designed to compare three screening strategies with the hypothesis that
347 pharmacist and community engagement would increase the number of patients
348 screened. After the results from the pilot phase, and according to the participants and
349 pharmacists’ opinions, the passive strategy was dropped.

350 The COVID-19 pandemic has, in many ways, disrupted the daily lives of people in
351 affected countries, especially regarding social dynamics (25). Countries applied
352 different measures to try to limit the spread of the virus; in Spain, different states of
353 alarm were decreed over time with perimeter closures, quarantines, curfews... as well
354 as the adoption of sanitary measures, such as safety distance, reduced personal
355 contact... Moreover, pharmacies have seen an increase in the services offered as a
356 result of the pandemic, such as antigen and serological tests. This fact may explain, in
357 part, the low recruitment speed observed in this pilot phase of the project.

358 Rapid diagnostic tests reduce the turnaround time, and with a proper referral
359 procedure, reduce losses to follow-up (26). RDTs are easily implemented at the
360 community level, but the sensitivity reported is not high enough to be used as the sole
361 screening technique. Based on this fact, in the present study, a strategy was selected

362 based on the combination of the RDT with a serology test using DBS, which can reach
363 a sensitivity up to 97% (20).

364 In 15/64 (23.44%) of the cases it was not possible to collect the DBS sample for
365 serology analysis. This may be due to the fact that, although finger pricking seems to
366 be a simple act, the fact of having to repeat it in order to obtain the DBS sample may
367 be a reason for participants to refuse. In addition, although in 49 cases it was possible
368 to collect DBS samples, 13 of them were collected improperly (either both circles were
369 not full or only one circle was impregnated). Unfortunately, after the pilot phase, the
370 project steering committee decided to remove this procedure as it was considered to
371 hinder the logistics of the screening process.

372 Similarly, in non-endemic countries, the choice of using RDTs for screening should be
373 followed by confirmation of the results in a reference laboratory (27). Challenges
374 related to the follow-up of patients by specialized units, especially in those with a
375 positive RDT, can be a real problem that can hinder the effectiveness and success of
376 the screening program. In order to try to lose as few patients as possible between
377 screening and subsequent clinical follow-up, the pharmacy booked an appointment for
378 diagnosis in the referral center. Participants not attending the scheduled visit were
379 contacted by phone or e-mail to offer them a new visit.

380 During the pilot phase, two participants had a positive result on the RDT. Both attended
381 the subsequent visit at the referral unit at HUVH, indicating that acquiring the
382 appointment at the pharmacy is a successful method to avoid the risk of losing the
383 patient. The positive RDT result of patient 6 was not confirmed neither by serology from
384 DBS and serum samples. On the other hand, participants with negative results were
385 carefully explained the meaning of the result and encouraged to perform the diagnosis
386 at his/her primary care center.

387 Implementation of screening actions for CD, coupled with early management of the
388 disease, is a cost-effective strategy (28); however, cost assessment prior to the large-
389 scale implementation of any strategy is essential for planning and refining procedures
390 and investment efforts (29).

391 To conclude, DBS sampling and the passive strategy are not suitable for CD screening
392 in community pharmacies. There is a need to expand the number of participating
393 pharmacies and individuals to determine whether conducting a RDT in community
394 pharmacies is an effective screening method to increase access to CD diagnosis in a
395 non-endemic area.

396

397 **Acknowledgments**

398 The authors thank Helena Kruyer for her assistance with the English.

399 CHAGAS-FARMACIA Study Group (in alphabetical order):

400 Francisca Aranzana, Conxita Alsina, Judith Barcelo, Begoña Barenys, Jose M. Bellart,
401 Montserrat Brio, Pere Casanovas, Bibiana de Dou, Eva Falco, Eduard Fernandez-
402 Rajal, Gloria Genis, Enrique Javier Gonzalez, Paula Hernandez, Francesca Iglesias,
403 Antoni Saus, J. Antoni Soriano, Aina Surroca, Marcelo Gabriel Sykuler, Guillermo
404 Vallejo, David Xuriguera.

405

406

407

408

References

- 410 1. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis)
411 [Internet]. 2020. Available from: [http://www.who.int/news-room/fact-](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
412 [sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))
- 413 2. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas
414 disease: A computational simulation model. *Lancet Infect Dis* [Internet].
415 2013;13(4):342–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
416 [3099\(13\)70002-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- 417 3. Stanaway JD, Roth G. The Burden of Chagas Disease: Estimates and
418 Challenges. *Glob Heart* [Internet]. 2015;10(3):139–44. Available from:
419 <http://dx.doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.001>
- 420 4. Navarro M, Reguero L, Subirà C, Blázquez-Pérez A, Requena-Méndez A.
421 Estimating chagas disease prevalence and number of underdiagnosed, and
422 undertreated individuals in Spain. *Travel Med Infect Dis*. 2022;47:102284.
- 423 5. Pérez-Molina J, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 2018;391:82–94.
- 424 6. Conselleria de Salut CV. Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de
425 actuación en la Comunitat Valenciana. Sanitat GCo de, editor. *Enfermedades*
426 *Emergentes*. 2009.
- 427 7. Galicia X de. Protocolo de cribado da enfermidade de chagas en mulleres
428 embarazadas. 2014.
- 429 8. Ciruela Navas P, Jané Checa M. Protocolo De Cribado, Diagnóstico Y
430 Tratamiento De La Enfermedad De Chagas En Mujeres Embarazadas
431 Latinoamericanas Y En Sus Hijos. Agència Salut Pública Catalunya [Internet].
432 2018;63. Available from:

- 434 9. Iglesias-Rus L, Romay-Barja M, Boquete T, Benito A, Blasco-Hernández T. The
435 role of the first level of health care in the approach to Chagas disease in a non-
436 endemic country. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(12):1–16.
- 437 10. Gómez i Prat J, Peremiquel-Trillas P, Claveria Guiu I, Choque E, Oliveira Souto
438 I, Serre Delcor N, et al. A Community-Based Intervention for the Detection of
439 Chagas Disease in Barcelona, Spain. *J Community Health* [Internet].
440 2019;44(4):704–11. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10900-019-00684-z>
- 441 11. Pérez-Molina JA, Norman F, López-Vélez R. Chagas disease in non-endemic
442 countries: Epidemiology, clinical presentation and treatment. *Curr Infect Dis Rep*.
443 2012;14(3):263–74.
- 444 12. World Health Organization. Guidelines for the diagnosis and treatment of
445 Chagas Disease. 2019.
- 446 13. Shah V, Ferrufino L, Gilman RH, Ramirez M, Saenza E, Malaga E, et al. Field
447 evaluation of the InBios Chagas detect plus rapid test in serum and whole-blood
448 specimens in Bolivia. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(12):1645–9.
- 449 14. Angheben A, Buonfrate D, Cruciani M, Jackson Y, Alonso-Padilla J, Gascon J,
450 et al. Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic chagas
451 disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS*
452 *Negl Trop Dis*. 2019;13(5):1–15.
- 453 15. McClendon-Weary B, Putnick DL, Robinson S, Yeung E. Little to Give, Much to
454 Gain—What Can You Do With a Dried Blood Spot? *Curr Environ Heal Reports*.
455 2020;7(3):211–21.
- 456 16. Ayorinde AA, Porteous T, Sharma P. Screening for major diseases in community
457 pharmacies: A systematic review. *Int J Pharm Pract*. 2013;21(6):349–61.

- 458 17. Fernandez-Lopez L, Reyes-Urueña J, Conway A, Saz J, Morales A, Quezadas
459 J, et al. The contribution of HIV point-of-care tests in early HIV diagnosis:
460 community-based HIV testing monitoring in Catalonia, 1995 to 2018.
461 *Eurosurveillance*. 2020;25(43):1–11.
- 462 18. Ibañez-Sanz G, Milà N, Vidal C, Rocamora J, Moreno V, Sanz-Pamplona R, et
463 al. Positive impact of a faecal-based screening programme on colorectal cancer
464 mortality risk. *PLoS One*. 2021;16(6 June):1–14.
- 465 19. Institut d'Estadística de C. Población Extranjera [Internet]. 2020 [cited 2022 Jan
466 28]. Available from:
467 [https://www.idescat.cat/poblacioextranjera/?b=10&geo=mun%3A080193&nac=](https://www.idescat.cat/poblacioextranjera/?b=10&geo=mun%3A080193&nac=d314#Plegable=geo)
468 [d314#Plegable=geo](https://www.idescat.cat/poblacioextranjera/?b=10&geo=mun%3A080193&nac=d314#Plegable=geo)
- 469 20. Silgado A, Gual-Gonzalez L, Sánchez-Montalvá A, Oliveira-Souto I, Goterris L,
470 Serre-Delcor N, et al. Analytical Evaluation of Dried Blood Spot and Rapid
471 Diagnostic Test as a New Strategy for Serological Community Screening for
472 Chronic Chagas Disease. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11.
- 473 21. Gómez i Prat J, Peremiquel-Trillas P, Guiu IC, Mendivelso JC, Choque E, de los
474 Santos JJ, et al. Comparative evaluation of community interventions for the
475 immigrant population of Latin American origin at risk for Chagas disease in the
476 city of Barcelona. *PLoS One*. 2020;15(7):1–15.
- 477 22. Avaria A, Gómez i Prat J. Si tengo Chagas es mejor que me muera El desafío
478 de incorporar una aproximación sociocultural a la atención de personas
479 afectadas por la enfermedad de Chagas. *Enferm emerg*. 2008;10(Supl 1):40–5.
- 480 23. Echeverría LE, Marcus R, Novick G, Sosa-Estani S, Ralston K, Zaidel EJ, et al.
481 WHF IASC roadmap on chagas disease. *Glob Heart*. 2020;15(1):1–31.
- 482 24. Velarde-Rodriguez M, Avaria-saavedra A, Gomez-i-Prat J, Jackson Y, De

483 Oliveira Junior AW, Camps-carmona B, et al. Need of comprehensive health
484 care for *T. cruzi* infected immigrants in Europe. Rev Soc Bras Med Trop.
485 2009;42(2):92–5.

486 25. Fontana Sierra L. Pandemic and rearticulation of social relations. Perifèria Rev
487 d'investigació i Form en Antropol. 2020;25(2):101.

488 26. Gubbins PO, Klepser ME, Dering-Anderson AM, Bauer KA, Darin KM, Klepser
489 S, et al. Point-of-care testing for infectious diseases: Opportunities, barriers, and
490 considerations in community pharmacy. J Am Pharm Assoc [Internet].
491 2014;54(2):163–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1331/JAPhA.2014.13167>

492 27. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L,
493 et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for
494 detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity
495 and nonendemicity. J Clin Microbiol. 2014;52(7):2506–12.

496 28. Requena-Méndez A, Bussion S, Aldasoro E, Jackson Y, Angheben A, Moore D,
497 et al. Cost-effectiveness of Chagas disease screening in Latin American
498 migrants at primary health-care centres in Europe: a Markov model analysis.
499 Lancet Glob Heal. 2017;5(4):e439–47.

500 29. Hoomans T, Severens JL. Economic evaluation of implementation strategies in
501 health care. Implement Sci. 2014;9:168.

502

503

504

505

506

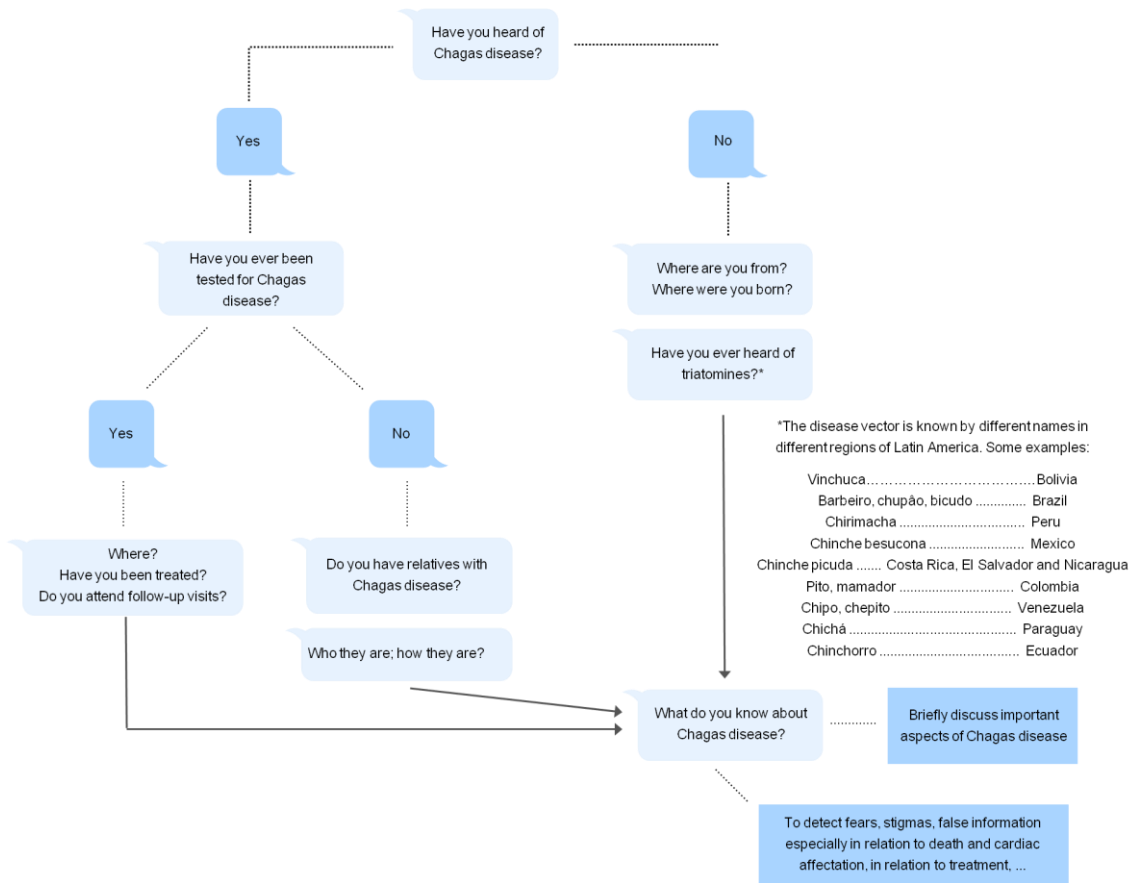


508

509 **S1 Fig.** Iconographic material used in this program (in Spanish). A) Poster displayed at
 510 the entrance of the pharmacy, visible from the outside. B) Leaflets with brief information
 511 about CD.

512

513



514

515

516 **S2 Fig.** Guidelines for approaching people from countries endemic for Chagas disease.

517

518

5

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, el paisaje epidemiológico de la EC ha cambiado debido a las corrientes migratorias desde zonas rurales a zonas urbanas en América Latina, e incluso fuera de esta región. Aún y la importancia que representa esta enfermedad, siguen existiendo limitaciones en cuanto al diagnóstico de los pacientes.

Esta Tesis Doctoral tiene el objetivo de proporcionar nuevas aproximaciones para aumentar la capacidad de detección molecular de ADN de *T. cruzi*, así como describir alternativas al cribado serológico convencional que permitan llegar a la población de riesgo.

Estrategias de mejora del diagnóstico molecular

A pesar de la limitación que presentan los ensayos de PCR como herramienta de diagnóstico en la fase crónica de la EC, esta técnica se ha utilizado cada vez más para la detección de ADN de *T. cruzi* como biomarcador indirecto en el seguimiento de pacientes tratados y de la eficacia al tratamiento en ensayos clínicos [160,164]. Varios de estos ensayos han utilizado diferentes estrategias y metodologías, no estandarizadas, para detectar fracasos de tratamiento [121,161,162,165].

Los trabajos "*Comparison of DNA extraction methods and real-time PCR assays for the molecular diagnostics of chronic Chagas disease*" y "*Usefulness of DNA extraction replicates to enhancing the detection of Trypanosoma cruzi DNA in blood samples from patients with chronic Chagas disease*" tuvieron como objetivo valorar estrategias de mejora del diagnóstico molecular de la infección crónica por *T. cruzi*. Para ello, se comparó la sensibilidad de 4 protocolos (combinando dos sistemas de extracción y dos

ensayos de PCR a tiempo real) y la realización de múltiples réplicas de extracción de ADN, respectivamente, en el contexto del ensayo clínico MULTIBENZ.

Siguiendo el protocolo de estudio MULTIBENZ, los porcentajes de positividad de la PCR a tiempo real obtenidos en pacientes crónicos no tratados (Argentina, 55%; Brasil, 60%; España, 42%) están en concordancia con lo reportado por estudios recientes realizados en estos países [154,166,167]. Destacar que la positividad obtenida en Colombia (29%) es menor a lo publicado [168], debido a que el número de pacientes cribados no fue equivalente al del resto de centros.

En la comparativa entre el método de extracción automatizado y manual no se encontraron diferencias significativas en los resultados cualitativos (46-48% y 54-57% de positividad, respectivamente; $p > 0,05$). Aun y no haberse encontrado diferencias entre ambos métodos, los sistemas de extracción automatizados presentan ventajas añadidas: disminuyen la variabilidad de los resultados y requieren menos tiempo de manipulación, reduciendo así el riesgo de contaminación cruzada, de importancia en laboratorios de biología molecular [115,116,169,170]. Todos estos factores favorecen la implementación de sistemas automatizados para el análisis de un número elevado de muestras, tanto en laboratorios de diagnóstico como en el contexto de los ensayos clínicos.

La menor eficacia en la extracción del método automatizado respecto al manual podría estar relacionada con el volumen de muestra inicial en cada procedimiento de extracción de ADN (200 y 300 μL , respectivamente). El volumen de muestra para el sistema de extracción automatizado se fijó en 200 μL , ya que durante la estandarización del protocolo se observó que volúmenes mayores de muestras de GEB inducían un elevado número de reacciones inhibidas. En la misma línea, un estudio reciente, utilizando un sistema automatizado basado en partículas magnéticas, reportó que el 56,50% de las muestras de GEB mostraron inhibición en la PCR, frente

a sólo el 3,10% para muestras de sangre con EDTA, utilizando el mismo volumen de muestra [171]. Estos resultados sugieren que los sistemas de extracción de ADN por partículas magnéticas pueden no ser capaces de eliminar eficazmente toda la guanidina-HCl, un conocido inhibidor de la PCR [172].

Siguiendo el objetivo de mejorar la sensibilidad del resultado final, se observó que la positividad se encuentra influenciada por el número de réplicas de extracción realizadas. En particular, mejoró cuando se analizaron tres réplicas de extracción frente a una sola réplica: de 40,25% a 55,35% ($p < 0,01$) en Argentina, de 38% a 60% ($p < 0,001$) en Brasil, de 26,10% a 29,35% ($p > 0,05$) en Colombia y de 33,55% a 42,10% ($p > 0,05$) en España. Sin embargo, la adición de una segunda réplica de extracción a una primera no aportó una mejoría significativa estadísticamente, excepto en Brasil (del 38% al 52,67%, $p < 0,05$). Este aumento de positividad, a pesar de no ser significativo en todos los países, mejora la capacidad de reclutamiento de pacientes en los ensayos clínicos, donde los criterios de inclusión requieren, en muchos casos, de al menos un resultado positivo de PCR en tiempo real.

La realización de tres réplicas de extracción también aumentó la detección de fracasos de tratamiento al final del seguimiento: de un 18,92% a un 27,03% para el tratamiento estándar de BNZ ($p > 0,05$), de un 14,10% a un 29,49% en la rama de dosis baja de BNZ ($p < 0,05$) y de un 13,33% a un 32% para el tratamiento de pauta corta de BNZ ($p < 0,05$). Disponer de un método con una elevada capacidad de detección es especialmente relevante para detectar fracasos de tratamiento y determinar la eficacia de nuevos esquemas terapéuticos.

El volumen de la muestra de sangre analizado es un factor importante en pacientes crónicos con bajos niveles de parasitemia, especialmente en los seguimientos post-tratamiento [163]. En un estudio precedente, Parrado, *et al.* [111] demostraron que la recogida de muestras sanguíneas de forma seriada (tres muestras de sangre

obtenidas en tres tomas distintas por paciente en cada visita de estudio) y la realización de múltiples réplicas de PCR mejoran los porcentajes de positividad obtenidos. Sin embargo, la estrategia de analizar tres réplicas de extracción de ADN a partir de una única muestra de sangre, implementada en este trabajo, mostró un aumento similar en la positividad de la PCR a tiempo real (alrededor del 5%) que la utilizada en el mentado estudio [111], pero con la ventaja de que es una aproximación mucho menos invasiva para el paciente. Por lo tanto, los resultados obtenidos respaldan el uso de réplicas de extracción de ADN de una sola muestra en lugar de la recogida seriada de muestras de sangre.

Respecto a la comparativa de los protocolos de amplificación de ADNsat, no se encontraron diferencias significativas entre los resultados obtenidos al utilizar las dos parejas de cebadores. Como era esperable, se consiguió una mayor concordancia entre los resultados de PCR obtenidos cuando se utilizó el mismo sistema de extracción (índice de kappa de 0,65 y 0,59 para los métodos manual y automatizado, respectivamente).

Por otro lado, sí que se observaron diferencias al comparar las medianas de los valores de Ct (del inglés, *threshold cycle*) de ambos protocolos de amplificación. Las medianas obtenidas con el nuevo conjunto de cebadores fueron inferiores a las obtenidas con el método original: 29,64 (rango intercuartil [IQR, del inglés *interquartile range*], 29,04-32,10) vs. 32,64 (IQR, 31,12-34,58), respectivamente, para la extracción de ADN con sistema automatizado ($p < 0,001$) y 30,01 (IQR, 27,96-32,81) vs. 31,01 (IQR, 29,93-32,70) para la extracción con sistema manual ($p < 0,05$). Estas diferencias confirman un mejor rendimiento para el nuevo conjunto de cebadores, tal y como se reportó previamente en el estudio de Ramírez *et al.* realizado en muestras contaminadas [127]. Aunque, hasta donde sabemos, esta es la primera vez que ha sido probado en muestras clínicas, el nuevo ensayo de PCR ya ha sido utilizado para

el análisis de muestras de mamíferos silvestres y domésticos en Argentina, Colombia y México, con buenos resultados [173].

El nuevo ensayo de PCR a tiempo real, además de incorporar la nueva pareja de cebadores para detectar ADNsat, también incorporó un nuevo conjunto de cebadores dirigidos a detectar la secuencia de IAC. El IAC es de utilidad para determinar el rendimiento de la extracción y monitorizar la presencia de inhibidores de la PCR [126,172]. En las muestras extraídas mediante el método manual, se encontró un mayor número de muestras con valores de Ct fuera de rango o no detectable para la diana de IAC, independientemente del ensayo de PCR utilizado (8 muestras para el sistema manual vs. 4 para el sistema automatizado). Sin embargo, en vista de que el análisis realizado en la comparativa fue solo cuantitativo, dichas muestras no se excluyeron del análisis. En el caso de estudios cuantitativos, sin embargo, se recomienda que las muestras positivas para ADNsat con valores de Ct atípicos para la diana de IAC sean reanalizadas, debido a que la carga parasitaria podría estar subestimada [126,172].

El hallazgo de muestras con resultados positivos para la diana ADNsat y con valores atípicos para la diana de IAC parece estar relacionado con la presencia de fibras de vidrio de las columnas del sistema manual que co-eluyen con el ADN. Estas fibras podrían interferir en la lectura de fluorescencia en el canal del compuesto fluorescente HEX (canal para la detección de la secuencia de IAC) pero sin afectar a la lectura en el canal del compuesto fluorescente FAM (canal para la detección de la secuencia de *T. cruzi*) [117].

Alternativas al cribado serológico convencional

El trabajo titulado “*Analytical evaluation of dried blood spot and rapid diagnostic test as a new strategy for serological community screening for chronic Chagas disease*” tuvo como objetivo evaluar dos procedimientos diagnósticos para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* mediante el uso de muestra de DBS y la realización de una PDR.

Actualmente, las pruebas serológicas disponibles para la detección de anticuerpos frente a *T. cruzi* están aprobadas para ser usadas con muestras de suero o plasma, mientras que no existe un protocolo específico para la muestra de DBS. En el presente estudio, la muestra de DBS se analizó mediante dos técnicas serológicas (E-CLIA y ELISA), teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la muestra de suero como referencia. Usando la técnica de E-CLIA, la muestra de DBS reportó unos resultados comparables a la muestra de suero, alcanzando una sensibilidad y especificidad de 96,90% y 100%, respectivamente. En un trabajo previo de Holguin *et al.* [141] también se obtuvo una sensibilidad similar, aunque la especificidad encontrada fue menor, probablemente debido a que se incluyó un mayor número de muestras negativas.

La cantidad de anticuerpos recuperados tras la reconstitución de la muestra de DBS puede variar según diversos factores, como el volumen de sangre empleado, los protocolos de recuperación, así como las condiciones de almacenamiento de la muestra [144,174]. Se obtuvieron valores de COI (índice de corte, del inglés *cut-off index*) mediante E-CLIA más bajos para las muestras de DBS en comparación a las muestras de suero (mediana de 138,10 vs. 243,30, respectivamente; $p < 0,05$). Esto se traduce en una disminución de la detección de anticuerpos en las muestras de DBS debido a los factores de dilución aplicados para la reconstitución de las muestras. Este hecho podría explicar también la detección de un 2,20% (3/138) de falsos negativos (índice de kappa de 0,95; intervalo de confianza (IC) del 95%, 0,893 a 1) de las

muestras de DBS analizadas con E-CLIA. Los valores de COI en estas 3 muestras con resultado negativo fueron menores en comparación a su respectiva muestra de suero (mediana para DBS, 0,5 vs. mediana para suero, 9,7).

Con el fin de determinar un protocolo óptimo de recuperación de anticuerpos en las muestras de DBS y mejorar la detección en muestras con bajo nivel de anticuerpos [141], es importante establecer un punto de corte óptimo de la técnica E-CLIA para este tipo de muestra. Por ello, se calculó un nuevo punto de corte para interpretar el resultado de las muestras de DBS que se estableció en $\geq 0,31$, más bajo al descrito para suero o plasma (≥ 1). Con la finalidad de evitar una interpretación errónea de los resultados, sería necesario un estudio futuro en el cual se incluya un mayor número de muestras para determinar de forma precisa el punto de corte para DBS.

Respecto al análisis de las muestras de DBS mediante la técnica de ELISA, la sensibilidad de la técnica disminuyó hasta el 77,4%, mientras que la especificidad se mantuvo en el 100%. En un 17,20% (21/122) de las muestras se obtuvieron falsos negativos (índice de kappa de 0,620; IC 95%, 0,472-0,768). La razón más plausible para esta baja correlación entre DBS-ELISA y las muestras de suero podría ser que restos de papel de filtro quedaran en el eluido interfiriendo en la realización de la técnica. Además, el volumen del tampón de elución utilizado (300 μ L de PBS) puede no ser el adecuado para la técnica de ELISA, por lo que sería requerido evaluar otros volúmenes del tampón de elución, con el fin de mantener el factor de dilución lo más bajo posible [142]. Desafortunadamente, debido al bajo volumen recuperado, no se pudo realizar un re-análisis de las muestras con resultados discrepantes.

El rendimiento analítico de la muestra de DBS difiere según la técnica de análisis empleada, por lo que una evaluación de este tipo de muestra es conveniente según el ensayo que quiera usarse para su análisis. Además, tener un protocolo optimizado y evaluado es importante para alcanzar resultados que se asemejen a los obtenidos con las muestras de suero.

En los últimos años, el uso de las PDR para la detección de anticuerpos contra *T. cruzi* se ha incrementado. Este tipo de pruebas proporcionan unos resultados rápidos, fiables y precisos si la prueba utilizada es lo suficientemente sensible y específica [135]. Además, el uso de PDR requiere de una menor complejidad técnica para su realización en comparación con las técnicas serológicas convencionales, lo que las hace idóneas para los cribados comunitarios.

Los datos de rendimiento analítico de la PDR obtenidos en nuestro estudio con la prueba *Trypanosoma Detect*TM *Rapid Test* (89,60% y 100% de sensibilidad y especificidad, respectivamente) se aproximan a los encontrados en otros estudios que evalúan la misma PDR [135,175–178]. Sin embargo, un 10,40% (8/77) de las muestras de nuestro estudio presentaron un resultado de falso negativo cuando se usó la PDR (índice de kappa, 0,853; IC 95%, 0,755-0,951). En otros estudios (en los cuales usan una versión mejorada de dicha PDR, denominada *Chagas Detect*TM *Plus Rapid Test*) también reportaron valores de sensibilidad más elevados, llegando hasta el 100% [136,137].

En términos de accesibilidad, una estrategia basada en la realización de una única PDR sería ventajosa para su aplicación a nivel comunitario. En los países no endémicos, en los que se estima una baja prevalencia de la EC, la elección de usar PDR para el cribado de la infección por *T. cruzi*, debido a su menor sensibilidad respecto a las técnicas convencionales, debe ir seguida de la confirmación del resultado en un laboratorio de referencia [179]. Atendiendo a los resultados globales

de este estudio, y a las condiciones de uso de cada una de las técnicas, se propone una estrategia basada en la combinación del uso de la PDR y la toma de muestra de DBS. El cribado inicial se realizaría mediante PDR con la posterior confirmación de los resultados negativos mediante DBS analizada con una técnica de elevada sensibilidad, como el ensayo E-CLIA. De esta forma, se alcanzaría una sensibilidad del 97%. No obstante, el hecho de añadir la muestra de DBS a la estrategia del uso de la PDR implicaría una reestructuración del equipo de trabajo sobre el terreno para poder realizar ambas pruebas en el menor tiempo posible.

Una estrategia de cribado basada en la utilización de PDR y DBS se implementó mediante un programa de cribado oportunista de la infección por *T. cruzi* en las farmacias comunitarias, descrito en el trabajo "*Opportunistic community screening of chronic Chagas disease using a rapid diagnosis test in pharmacies in Barcelona (Catalonia, Spain): study protocol and pilot phase results*".

La EC presenta un elevado porcentaje de infradiagnóstico, por lo que es importante aplicar estrategias efectivas para reforzar la capacidad de los sistemas de salud de detectar casos de infección por *T. cruzi*. Por ello, las actividades en la comunidad son una herramienta fundamental para facilitar la accesibilidad hacia la población de riesgo, rompiendo así barreras psicoemocionales o administrativas [79]. Según distintos estudios realizados en Europa [79,180–183], las actividades que incluyen un cribado *in situ* han demostrado ser muy eficaces.

Para el desarrollo de este programa de cribado se usó una estructura ya existente en el sistema sanitario: las farmacias comunitarias. Estas son un establecimiento sanitario privado que trabaja de forma integrada y coordinada en la gestión de los procesos de salud de la población. Así, constituyen un recurso valioso para las estrategias de cribado debido al equilibrio territorial, la confianza de los consumidores, la capilaridad y la cohesión social, además de la profesionalidad y la cualificación de los trabajadores

[184]. En España se han llevado a cabo iniciativas previas de cribado en farmacias para otras patologías, como programas de cribado oportunista, bajo demanda, del VIH [185] y programas de cribado sistemático del cáncer colorrectal [186], con buenos resultados. Ahora bien, hasta donde sabemos, no se ha llevado a cabo ningún programa de cribado para la detección de la infección por *T. cruzi* en las farmacias comunitarias.

Para el abordaje de los pacientes se establecieron tres estrategias distintas: pasiva (los farmacéuticos tienen una actitud de espera para reclutar a la población objetivo), activa (los farmacéuticos ofrecen proactivamente la PDR) y activa-comunitaria (igual que la activa, pero con la participación añadida de agentes comunitarios). Además, se realizó un curso de formación a los farmacéuticos que participarían en el estudio, se creó un circuito para la recogida de datos, el envío de muestras y la derivación de los pacientes a un centro de referencia. El cribado se realizó mediante la PDR *Trypanosoma Detect*™ y la recogida de muestras de DBS.

Debido a que un factor que contribuye al infradiagnóstico de la enfermedad es el desconocimiento por parte del profesional sanitario [81,98], se realizó una encuesta de conocimientos acerca de la EC tanto antes como después del curso de formación. En dicha encuesta, las categorías de 'epidemiología' y 'diagnóstico y tratamiento' fueron las que menos respuestas correctas obtuvieron. Esto señala la importancia de enfatizar en estos aspectos ya que, aunque el vector no está presente en España, existen otras vías de transmisión que son particularmente relevantes en áreas no endémicas, lo cual era desconocido por muchos de los profesionales.

Durante el programa piloto del estudio, se incluyeron un total de 64 participantes, procedentes la mayoría de Bolivia (28,10%), en concordancia con lo reportado en zona no endémica [43]. Solo un 3% de las PDR resultaron positivas (2/64), porcentaje menor al encontrado en otros programas de cribado realizados en España [79,82,86].

Tras finalizar la fase piloto del estudio, se realizó un análisis DAFO (debilidades, amenazas, fortalezas y oportunidades) para identificar y analizar aspectos relevantes del proyecto. La implicación de agentes comunitarios, la organización y coordinación del proyecto por investigadores experimentados y la formación específica del personal de farmacia fueron consideradas como principales puntos fuertes. Además, destacar la colaboración con unidades de referencia en el ámbito hospitalario para el manejo de los pacientes, así como la disponibilidad de realizarse el test de forma gratuita y dentro de una amplia oferta horaria en distritos con una alta prevalencia de personas de origen latinoamericano.

El diagnóstico de la EC produce un rango de reacciones en los individuos, desde el escepticismo hasta el miedo o la ansiedad [187,188], por lo que el abordaje de los participantes debe realizarse atendiendo a estos aspectos. Para este fin, en este estudio se incluyó la participación de la figura del 'paciente experto', una persona que ha sido diagnosticada de EC y que tiene experiencia de primera mano [189]. Esta persona colaboró en el diseño del estudio centrado en el abordaje y seguimiento de los participantes, así como el plan de comunicación y difusión del proyecto. La participación de personas afectadas en la elaboración de estrategias de acción permite tener en cuenta las percepciones y experiencias de dichas personas, mejorando así el enfoque del programa [190]. Además, su participación pretende reducir la reticencia a participar a través de la creación de lazos de confianza con la comunidad, eliminando el estigma social que rodea la EC.

Entre las oportunidades se encuentran las de conocer la prevalencia de la EC en la población de Barcelona y la futura implementación de un plan nacional para el cribado de la EC. La aplicación de acciones de cribado, junto con el tratamiento precoz de la enfermedad, se ha determinado como una estrategia coste-efectiva [191]; sin embargo, la evaluación de los costes antes de la aplicación a gran escala de cualquier

estrategia es esencial para planificar y perfeccionar los procedimientos y los esfuerzos de inversión [192].

Como amenazas, la barrera cultural y psicosocial, la reticencia a realizarse el cribado de la EC, el estigma y el miedo a conocer un resultado positivo de la PDR, así como la pérdida de seguimiento de los pacientes. En un estudio cualitativo realizado dentro del proyecto para determinar su aceptación entre la población de América Latina, la mayoría de los encuestados (41,50%) afirmó que no querían ser cribados para conocer su estado frente a la infección por *T. cruzi*. La falta de información y concienciación de las personas afectadas, el miedo y el estigma que persiguen a la EC, la asociación de dicha enfermedad a la pobreza y la exclusión social, el miedo a perder el trabajo, podrían ser motivos por los que la población de riesgo no sienta la necesidad de buscar la asistencia sanitaria necesaria [193,194]. Esto remarca la necesidad de incluir estrategias sociales que empoderen y mejoren el conocimiento de la población más susceptible acerca de la enfermedad [190].

Los retos relacionados con el seguimiento de los pacientes por parte de las unidades especializadas, en aquellos con una PDR positiva, pueden dificultar la eficacia y el éxito del programa de cribado. Para intentar maximizar la adherencia del participante al seguimiento clínico posterior, en la farmacia se asignó una visita médica para que el paciente pudiera ser atendido por parte de la unidad de referencia. Además, los participantes que no acudían a la visita programada eran contactados por teléfono o correo electrónico para ofrecerles una nueva visita. Durante la fase piloto, dos participantes tuvieron un resultado positivo en la PDR y ambos acudieron a la visita posterior en la unidad de referencia. Esto, aunque teniendo en cuenta el bajo número de pacientes, indica que adquirir la cita en la farmacia es un método adecuado para evitar el riesgo de perder al paciente.

La baja capacidad de reclusión en la farmacia se determinó como una debilidad, hecho que se vio explicado por la reticencia al cribado de la EC por la población, así como la pandemia de COVID-19. Esto último ha alterado en muchos aspectos la vida cotidiana de las personas, especialmente en lo que se refiere a la dinámica social [195] con la aplicación de diferentes medidas para intentar limitar la propagación del virus: cuarentenas, toques de queda, cierres perimetrales, reducción del contacto personal... Asimismo, las farmacias vieron aumentado su carga de trabajo a raíz de la pandemia.

Se observó que la estrategia de captación pasiva fue la que menor número de participantes incluyó (13/64; 20,30%), por lo que esta fue eliminada con el fin de priorizar aquellas estrategias con mayor tasa de reclutamiento: activa y activa-comunitaria. Casi la mitad de los participantes (29/64; 45,31%) accedieron al programa a través de la comunicación por parte del personal de la farmacia, lo que refuerza la necesidad de tener un abordaje activo.

La toma de muestra de DBS fue identificada como otra debilidad del proyecto. En un 23,44% (15/64) de los pacientes a los que se les realizó la PDR no se pudo recoger la muestra de DBS para análisis serológicos. Esto puede deberse a que, aunque la punción en el dedo parece un acto sencillo, el hecho de tener que volver a pincharse para poder obtener la muestra de DBS puede ser un motivo de rechazo para los participantes. Además, aunque en 49 casos fue posible recoger muestras de DBS, 13 (26,53%) de ellas se recogieron de forma incorrecta (o bien los dos círculos no estaban llenos o bien sólo se impregnó un círculo). Tras este análisis, se decidió eliminar este procedimiento por considerar que dificultaba la logística del proceso de cribado.

6

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

- I. Los dos métodos utilizados para la extracción de ADN de *T. cruzi* (manual y automatizado) en muestras GEB obtuvieron resultados cualitativos comparables.
- II. La posibilidad de automatización y la facilidad de uso de los sistemas automatizados de extracción favorecen su implementación para el análisis de un número elevado de muestras.
- III. La realización de tres réplicas de extracción de ADN respecto a una sola réplica mejora la detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR a tiempo real, tanto en el cribado como en el seguimiento post-tratamiento de pacientes con infección crónica.
- IV. El nuevo conjunto de cebadores para la detección de ADNsat de *T. cruzi* obtuvo valores de Ct menores en comparación al conjunto de cebadores previamente descrito, lo que indica un mejor rendimiento de la reacción.
- V. El número de muestras inhibidas o con valores atípicos del IAC fue mayor en el caso de las muestras extraídas mediante el sistema manual.
- VI. El uso de la muestra de DBS analizada mediante la técnica E-CLIA mostró un rendimiento analítico similar al obtenido con la muestra de suero (sensibilidad y especificidad del 97% y 100%, respectivamente).

- VII. El nuevo punto de corte para interpretar el resultado de la técnica E-CLIA en muestra de DBS fue más bajo ($\geq 0,31$) que el descrito para la muestra de suero (≥ 1).
- VIII. El uso de la muestra de DBS analizada mediante la técnica de ELISA mostró una sensibilidad menor (77%) y una especificidad del 100%, respecto a la muestra de suero.
- IX. La PDR evaluada (*Trypanosoma Detect*TM) obtuvo una sensibilidad y especificidad del 89% y 100%, respectivamente.
- X. Una estrategia secuencial basada en la realización de la PDR y la confirmación de los resultados negativos mediante DBS, analizada con E-CLIA, presenta una sensibilidad del 97%.
- XI. La toma de muestra de DBS y la estrategia de reclutamiento pasiva no fueron adecuadas para el cribado de la EC en el estudio piloto realizado en las farmacias comunitarias.
- XII. Es necesario ampliar el número de farmacias y personas participantes para determinar si el cribado realizado en las farmacias comunitarias es eficaz para incrementar el acceso al diagnóstico de la EC en la ciudad de Barcelona.

7

PERSPECTIVAS DE FUTURO

7. PERSPECTIVAS DE FUTURO

A raíz de los trabajos que componen esta Tesis Doctoral, el conjunto de resultados obtenidos abre diferentes puntos de acción para seguir mejorando en el estudio de la fase crónica de la EC.

En primer lugar, destacar la importancia de seguir estudiando nuevos protocolos de detección molecular con el fin de obtener una técnica altamente sensible. En relación al nuevo conjunto de cebadores analizado en la presente Tesis Doctoral, estudios en los que se incluyan un número mayor de pacientes serán necesarios antes de introducir la nueva PCR para la detección de ADNsat de *T. cruzi*. Además, sería interesante estudiar y evaluar el uso de las dos dianas más ampliamente usadas, ADNsat y ADNk, de forma simultánea en formato de PCR múltiple. Debido a la diversidad genética que presenta *T. cruzi*, estos estudios tienen especial relevancia en que sean realizados en distintas áreas geográficas para poder abarcar el máximo de UDTs posibles.

Respecto a los sistemas de extracción, sería importante un estudio en el que se incluyan pacientes de otras zonas, al igual que otras formas de la EC (aguda y crónica determinada) para poder estandarizar el número de réplicas necesario, y alcanzar un equilibrio entre el aumento de sensibilidad y el gasto de recursos para el uso de la PCR en diagnóstico o en ensayos clínicos. Además, otros estudios que incluyan diferentes sistemas de extracción o nuevos test de amplificación de ácidos nucleicos, como la PCR digital, podrían mejorar la detección de ADN en pacientes con infección crónica.

Con respecto al valor de corte obtenido para las muestras de DBS mediante la técnica serológica E-CLIA, un estudio en el que se incluya un mayor número de muestras, así como muestras infectadas con otros tripanosomátidos (como *Leishmania* spp.), sería

interesante para determinar de forma óptima el protocolo de recuperación de anticuerpos y el valor de corte correspondiente. Esto también serviría para evaluar analíticamente la serología con muestras de DBS y E-CLIA en distintas áreas de zona endémica, abarcando distintas UDTs del parásito.

También sería interesante examinar si la estrategia de cribado secuencial planteada de en la presente Tesis (realizar PDR y la confirmación de los resultados negativos con DBS) podría ser aplicada en otros contextos epidemiológicos. Para ello, sería necesario aplicar este algoritmo en distintas zonas geográficas del área endémica, analizando tanto su utilidad como la capacidad de implementación.

Los resultados obtenidos en el análisis de la fase piloto del proyecto de cribado en las farmacias comunitarias han permitido modificar aspectos del protocolo con el fin de mejorarlo. Actualmente, se ha ampliado el estudio aumentando el número de farmacias participantes, incluyendo los cambios propuestos. Este proyecto incluirá, además, un análisis de coste-efectividad para determinar si el cribado de la EC en las farmacias comunitarias es una estrategia rentable y aplicable a largo plazo.

8

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Neglected tropical diseases [Internet]. 2022.
2. WHO. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. Geneva: World Health Organization (https://www.who.int/neglected_diseases/Revised-DraftNTD-Roadmap-23Apr2020.pdf). World Health Organization. Geneva: World Health Organization; 196 p.2020.
3. Mitra AK, Mawson AR. Neglected tropical diseases: Epidemiology and global burden. *Trop Med Infect Dis.* 2(3), 36 (2017).
4. Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, et al. Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *J Phys Oceanogr.* 49(6), 1–13 (2019).
5. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 102(SUPPL. 1), 75–85 (2007).
6. Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1, 159–218 (1909).
7. Coutinho M, Freire O, Dias JCP. The Noble Enigma: Chagas' Nominations for the Nobel Prize. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94(Suppl. 1), 123–9 (1999).
8. Mazza S. La enfermedad de Chagas en la república Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 47, 273–88 (1949).
9. Aufderheide AC, Salo W, Madden M, Streitz J, Buikstra J, Guhl F, et al. A 9,000-year record of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(7), 2034–9 (2004).
10. Schoch C. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. [Internet]. Database. 2020.
11. Maslov DA, Opperdoes FR, Kostygov AY, Hashimi H, Lukeš J, Yurchenko V. Recent advances in trypanosomatid research: Genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology.* 146(1), 1–27 (2019).
12. Bartholomeu DC, Teixeira SMR, El-Sayed NMA, Telleria J, Svoboda M. Genetics of *Trypanosoma cruzi*. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. Second Edi. Elsevier; p. 429–54 (2017).
13. Callejas-Hernández F, Herreros-Cabello A, del Moral-Salmoral J, Fresno M, Gironès N. The complete mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: Maxicircles and minicircles. *Front Cell Infect Microbiol.* 11(June), 1–11 (2021).
14. Junqueira ACV, Degraeve W, Brandão A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. *Trends Parasitol.* 21(6), 270–2 (2005).
15. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran A, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science (80-).* 309(5733), 399–400 (2005).

16. Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(11 I), 3356–60 (1984).
17. Sloof P, Bos JL, Konings AFJM, Menke HH, Borst P, Gutteridge WE, et al. Characterization of satellite DNA in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Biol*. 167(1), 1–21 (1983).
18. Gaunt MW, Yeo M, Frame IA, Stothard JR. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*. 421(6926), 936–9 (2003).
19. Berry ASF, Salazar-Sánchez R, Castillo-Neyra R, Borrini-Mayorí K, Chipana-Ramos C, Vargas-Maquera M, et al. Sexual reproduction in a natural *Trypanosoma cruzi* population. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(5), 1–17 (2019).
20. Zingales B, Andrade S, Briones M, Campbell D, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104(7), 1051–4 (2009).
21. Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Maia Da Silva F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 136(6), 641–55 (2009).
22. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: The need for an integrated approach. *Int J Parasitol*. 28(1), 85–104 (1998).
23. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 12(2), 240–53 (2012).
24. Clayton J. Chagas disease 101. *Nature*. 465(7301 SUPPL.), 2009–10 (2010).
25. Zingales B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Trop*. 184, 38–52 (2018).
26. Martins A, Gomes A, Mendonça E, Fietto, Juliana. Lopes R, Santana L, Oliveira M, et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*. 16(1), 45–58 (2012).
27. Pérez-Molina J, Molina I. Chagas disease. *Lancet*. 391, 82–94 (2018).
28. Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med*. 373(5), 456–66 (2015).
29. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 54(6), 845–52 (2012).
30. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 115(1–2), 22–7 (2010).
31. Carlier Y, Truyens C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. *Acta Trop*. 151(1), 103–15 (2015).
32. Schijman AG. Congenital Chagas Disease. *Perspect Med Virol*. 13(06), 223–58 (2006).
33. Brutus L, Castillo H, Bernal C, Salas NA, Schneider D, Santalla JA, et al. Short report: Detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia during pregnancy and delivery as a risk factor for congenital chagas disease. *Am J Trop Med Hyg*. 83(5), 1044–7 (2010).

34. Wendel S, Gonzaga AL. Chagas' disease and blood transfusion: A New World problem? *Vox Sang.* 64(1), 1–12 (1993).
35. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Bula I, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion.* 55(6), 1249–55 (2015).
36. Smith K, Marcos LA. Pathogenesis of Chagas disease: an emphasis for transplant patient populations. *Curr Trop Med Reports.* 6(1)(2019).
37. Antinori S, Milazzo L. Chagas disease, leishmaniasis, and malaria in solid organ transplant recipients. *OBM Transplant.* 3(1), 1–1 (2018).
38. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 14(4), 659–88 (2001).
39. Brenière SF, Waleckx E, Aznar C. Other forms of transmission: Blood transfusion, organ transplantation, laboratory accidents, oral and sexual transmission. In: Telleria J, Tibayrenc M, editors. American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research. Second Edi. Elsevier; p. 561–782017.
40. World Health Organization. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec.* 90(6), 33–44 (2015).
41. Loureiro Werneck G. The challenges for targeting Chagas disease for elimination as a public health problem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 117(6), 6–7 (2022).
42. Magalhães LMD, Gollob KJ, Zingales B, Dutra WO. Pathogen diversity, immunity, and the fate of infections: lessons learned from *Trypanosoma cruzi* human–host interactions. *The Lancet Microbe.* 5247(21), 1–12 (2022).
43. Navarro M, Reguero L, Subirà C, Blázquez-Pérez A, Requena-Méndez A. Estimating Chagas disease prevalence and number of underdiagnosed, and undertreated individuals in Spain. *Travel Med Infect Dis.* 47, 102284 (2022).
44. World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis) [Internet]. 2020.
45. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. *Lancet Infect Dis.* 13(4), 342–8 (2013).
46. WHO. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018. (2018).
47. Velásquez-Ortiz N, Herrera G, Hernández C, Muñoz M, Ramírez JD. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi*: Geographical and biological distribution in the Americas. *Sci Data.* 9(1), 1–8 (2022).
48. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over six thousand *Trypanosoma cruzi* strains classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an inventory. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(8), 1–19 (2016).
49. Abras A, Gállego M, Muñoz C, Juiz NA, Ramírez JC, Cura CI, et al. Identification of *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units (DTUs) in Latin-American migrants in Barcelona (Spain). *Parasitol Int.* 66(2), 83–8 (2017).
50. Perez-Molina JA, Poveda C, Martinez-Perez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M, et al. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol.* 21, 440–2 (2014).

51. Martínez-Pérez A, Poveda C, Ramírez JD, Norman F, Gironés N, Guhl F, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi*'s Discrete Typing Units in a cohort of Latin American migrants in Spain. *Acta Trop.* 157, 145–50 (2016).
52. de Oliveira MT, Sulleiro E, Silgado Gimenez A, de Lana M, Zingales B, da Silva JS, et al. Quantification of parasite burden of *Trypanosoma cruzi* and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain. *PLoS Negl Trop Dis.* 14(6), 1–14 (2020).
53. Organización Mundial de la Salud. Enfermedad de Chagas: control y eliminación - 63a Asamblea Mundial de la Salud. *a63/17 22 Abril.* , 1–5 (2010).
54. Organización Panamericana de la Salud. Control, interrupción de la transmisión y eliminación de la enfermedad de Chagas como problema de salud pública. Washington, D.C.; 2019.
55. Sosa-Estani S, Segura EL. Integrated control of Chagas disease for its elimination as public health problem - A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(3), 289–98 (2015).
56. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: A systematic review and meta-analysis. *BJOG.* 121(1), 22–33 (2013).
57. Barona-Vilar C, Giménez-Martí MJ, Fraile T, González-Steinbauer C, Parada C, Gil-Brusola A, et al. Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Latin American women and congenital transmission rate in a non-endemic area: The experience of the Valencian Health Programme (Spain). *Epidemiol Infect.* 140(10), 1896–903 (2012).
58. Avila Arzanegui O, Liendo Arenaza P, Martínez Indart L, Martínez Astorkiza T, Pocheville Guruceta MI, Egurbide Arberas MV. Prevalencia de la infección por *Trypanosoma cruzi* y transmisión vertical en mujeres gestantes latinoamericanas en un área de salud de Vizcaya. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(4), 210–6 (2013).
59. Muñoz J, Coll O, Juncosa T, Vergés M, Pino M Del, Fumado V, et al. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant latin american women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. *Clin Infect Dis.* 48(12), 1736–40 (2009).
60. Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, Martín-Nalda A, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: Evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 87(5), 832–6 (2012).
61. Basile L, Ciruela P, Requena-Méndez A, José Vidal MA, Dopico E, Martín-Nalda A, et al. Epidemiology of congenital Chagas disease 6 years after implementation of a public health surveillance system, Catalonia, 2010 to 2015. *Eurosurveillance.* 24(26), 1–16 (2019).
62. Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(10)(2014).
63. Ciruela Navas P, Jané Checa M. Protocolo de cribado, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y en sus hijos. *Agència Salut Pública Catalunya.* , 63 (2018).

64. Conselleria de Salut CV. Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de actuación en la Comunitat Valenciana. Sanitat GCo de, editor. Enfermedades Emergentes. 2009.
65. Galicia X de. Protocolo de cribado da enfermidade de chagas en mulleres embarazadas. 2014.
66. Regione Toscana. Programma regionale per la prevenzione e il controllo della malattia di Chagas congenita: indicazioni per l'assistenza in gravidanza. *Cons Sanit Reg.* (2012).
67. Secretaría General Iberoamericana. Documento de formulación de la Iniciativa Iberoamericana sobre Chagas congénito: "Ningún bebé con Chagas: el camino hacia nuevas generaciones libres de Chagas." Andorra; p. 1–232021.
68. Pan American Health Organization. Chagas disease in the Americas: a review of the current public health situation and its vision for the future. *Paho.* (May), 18 (2018).
69. Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet.* 375(9723), 1388–402 (2010).
70. Sistema de Información del Sistema Nacional para la Seguridad Transfusional. Actividad centros y servicios transfusión [Internet]. Informe actividad 2020. 2020.
71. Len O, Los-Arcos I, Aguado JM, Blanes M, Bodro M, Carratalà J, et al. Documento de consenso del Grupo de Estudio de la Infección en el Trasplante (GESITRA) perteneciente a la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) sobre los criterios de selección del donante de órganos sólidos en relación a las enfermedades infecciosas [Internet]. Organización Nacional de Trasplante. 2020.
72. Len O, Garzoni C, Lumbreras C, Molina I, Meije Y, Pahissa A, et al. Recommendations for screening of donor and recipient prior to solid organ transplantation and to minimize transmission of donor-derived infections. *Clin Microbiol Infect.* 20(s7), 10–8 (2014).
73. Huprikar S, Bosserman E, Patel G, Moore A, Pinney S, Anyanwu A, et al. Donor-derived *Trypanosoma cruzi* infection in solid organ recipients in the United States, 2001-2011. *Am J Transplant.* 13(9), 2418–25 (2013).
74. Pierrotti LC, Carvalho NB, Amorin JP, Pascual J, Kotton CN, López-Vélez R. Chagas disease recommendations for solid-organ transplant recipients and donors. *Transplantation.* 102(2S), S1–7 (2018).
75. Benvenuti LA, Rogério A, Cavalcanti MM, Nishiya AS, Levi JE. An autopsy-based study of *Trypanosoma cruzi* persistence in organs of chronic chagasic patients and its relevance for transplantation. *Transpl Infect Dis.* 19(6), 1–6 (2017).
76. Pinazo MJ, Miranda B, Rodríguez-Villar C, Altclas J, Serra MB, García-Otero EC, et al. Recommendations for management of Chagas disease in organ and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. *Transplant Rev.* 25(3), 91–101 (2011).
77. Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, et al. Chagas disease in european countries: The challenge of a surveillance system. *Eurosurveillance.* 16(37), 3 (2011).

78. Navarro M, Reguero L, Subirà C, Blázquez-Pérez A, Requena-Méndez A. Estimating Chagas disease prevalence and number of underdiagnosed, and undertreated individuals in Spain. *Travel Med Infect Dis.* 47(102284) (2022).
79. Gómez i Prat J, Peremiquel-Trillas P, Guiu IC, Mendivelso JC, Choque E, de los Santos JJ, et al. Comparative evaluation of community interventions for the immigrant population of Latin American origin at risk for Chagas disease in the city of Barcelona. *PLoS One.* 15(7), 1–15 (2020).
80. Iglesias-Rus L, Romay-Barja M, Boquete T, Benito A, Blasco-Hernández T. The role of the first level of health care in the approach to Chagas disease in a non-endemic country. *PLoS Negl Trop Dis.* 13(12), 1–16 (2019).
81. Romay-Barja M, Iglesias-Rus L, Boquete T, Benito A, Blasco-Hernández T. Key Chagas disease missing knowledge among at-risk population in Spain affecting diagnosis and treatment. *Infect Dis Poverty.* 10(1), 1–11 (2021).
82. Gómez i Prat J, Peremiquel-Trillas P, Claveria Guiu I, Choque E, Oliveira Souto I, Serre Delcor N, et al. A community-based intervention for the detection of Chagas disease in Barcelona, Spain. *J Community Health.* 44(4), 704–11 (2019).
83. Sanmartino M, Forsyth CJ, Avaria A, Velarde-Rodriguez M, Gómez I Prat J, Albajar-Viñas P. The multidimensional comprehension of Chagas disease. Contributions, approaches, challenges and opportunities from and beyond the information, education and communication field. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 116(1), 1–11 (2021).
84. Sanmartino M, Saavedra AA, Gomez i Prat J, Barba MC, Albajar-Viñas P. Do not be afraid of us: Chagas disease as explained by people affected by it. *Interface Commun Heal Educ.* 19(55), 1063–75 (2015).
85. Imaz-Iglesia I, Miguel LGS, Ayala-Morillas LE, García-Pérez L, González-Enríquez J, Blasco-Hernández T, et al. Economic evaluation of chagas disease screening in Spain. *Acta Trop.* 148, 77–88 (2015).
86. Ramos-Sesma V, Navarro M, Llenas-García J, Gil-Anguita C, Torrus-Tendero D, Wikman-Jorgensen P, et al. Community-based screening of Chagas disease among Latin American migrants in a non-endemic country: an observational study. *Infect Dis Poverty.* 10(1), 1–14 (2021).
87. Ouaraab Essadek H, Claveria Guiu I, Caro Mendivelso J, Sulleiro E, Pastoret C, Navarro M, et al. Cribado in situ de la enfermedad de Chagas con una intervención comunitaria: ¿puede mejorar la accesibilidad al diagnóstico y al tratamiento? *Gac Sanit.* 31(5), 439–40 (2017).
88. Claveria Guiu I, Caro Mendivelso J, Ouaraab Essadek H, González Mestre MA, Albajar-Viñas P, Gómez i Prat J. The Catalan expert patient programme for Chagas disease: An approach to comprehensive care involving affected individuals. *J Immigr Minor Heal.* 19(1), 80–90 (2017).
89. Junqueira C, Caetano B, Bartholomeu DC, Melo MB, Ropert C, Rodrigues MM, et al. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: Lessons for and beyond Chagas disease. *Expert Rev Mol Med.* 12(September), 1–23 (2010).
90. Andrade D V., Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New global challenges for an old neglected disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(7), 1–10 (2014).
91. Kellie S, Al-Mansour Z. Overview of the immune system. *Micro- Nanotechnol Vaccine Dev.* 357, 63–81 (2017).

92. Cristovão-Silva AC, Brelaz-de-Castro MCA, Hernandes MZ, Pereira VRA. Chagas disease: Immunology of the disease at a glance. *Cytokine Growth Factor Rev.* (August)(2021).
93. Murcia L, Carrilero B, Saura D, Asunción Iborra M, Segovia M. Diagnosis and treatment of Chagas disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(1), 26–34 (2013).
94. Ribeiro AL, Nunes MP, Teixeira MM, Rocha MOC. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 9(10), 576–89 (2012).
95. Iantorno G, Bassotti G, Kogan Z, Lumi CM, Cabanne AM, Fisogni S, et al. The enteric nervous system in chagasic and idiopathic megacolon. *Am J Surg Pathol.* 31(3), 460–8 (2007).
96. Bern C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis.* 25(4), 450–7 (2012).
97. Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 25, 29–37 (2007).
98. Alonso-Padilla J, Cortés-Serra N, Pinazo MJ, Bottazzi ME, Abril M, Barreira F, et al. Strategies to enhance access to diagnosis and treatment for Chagas disease patients in Latin America. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 17(3), 145–57 (2019).
99. Strout RG. A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasitol.* 48(1), 100 (1962).
100. Feilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM. Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol.* 18(2), 327–30 (1983).
101. Luquetti AO, Rassi A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: Brener Z, Andrade Z, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; p. 344–782000.
102. Schijman AG, Alonso-Padilla J, Longhi SA, Picado A. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: From field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 116(1), 1–13 (2021).
103. Balouz V, Agüero F, Buscaglia CA. Chagas disease diagnostic applications: present knowledge and future steps. *Adv Parasitol.* 97, 1–45 (2017).
104. Kirchhoff L V., Votava JR, Ochs DE, Moser DR. Comparison of PCR and microscopic methods for detecting *Trypanosoma cruzi*. *J Clin Microbiol.* 34(5), 1171–5 (1996).
105. Bua J, Volta BJ, Perrone AE, Scollo K, Velázquez EB, Ruiz AM, et al. How to Improve the Early Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection: Relationship between validated conventional diagnosis and quantitative DNA amplification in congenitally infected children. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(10), 12–4 (2013).
106. Velázquez EB, Rivero R, Rissio AM De, Malagrino N, Esteva MI, Riarte AR, et al. Predictive role of polymerase chain reaction in the early diagnosis of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta Trop.* 137, 195–200 (2014).
107. Diez M, Favalaro L, Bertolotti A, Burgos JM, Vigliano C, Lastra MP, et al. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. *Am J Transplant.* 7(6), 1633–40 (2007).

108. Cura CI, Lattes R, Nagel C, Gimenez MJ, Blanes M, Calabuig E, et al. Early molecular diagnosis of acute Chagas disease after transplantation with organs from *Trypanosoma cruzi*-infected donors. *Am J Transplant.* 13(12), 3253–61 (2013).
109. Monge-Maillo B, López-Vélez R. Challenges in the management of Chagas disease in Latin-American migrants in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 23(5), 290–5 (2017).
110. Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 184, 59–66 (2018).
111. Parrado R, Ramirez JC, de la Barra A, Alonso-Vega C, Juiz N, Ortiz L, et al. Usefulness of serial blood sampling and PCR replicates for treatment monitoring of patients with chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 63(2), 1–12 (2019).
112. Bisio M, Seidenstein ME, Burgos JM, Ballering G, Risso M, Pontoriero R, et al. Urbanization of congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: Prospective polymerase chain reaction study in pregnancy. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 105(10), 543–9 (2011).
113. Kalendar R, Boronnikova S, Seppänen M. Isolation and purification of DNA from complicated biological samples. *Methods Mol Biol.* 2222, 57–67 (2021).
114. Tan SC, Yiap BC. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *J Biomed Biotechnol.* 2013(628968)(2009).
115. Riemann K, Adamzik M, Frauenrath S, Egensperger R, Schmid KW, Brockmeyer NH, et al. Comparison of manual and automated nucleic acid extraction from whole-blood samples. *J Clin Lab Anal.* 21(2), 71–6 (2007).
116. Dundas N, Leos NK, Mitui M, Revell P, Rogers BB. Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction. *J Mol Diagnostics.* 10(4), 311–6 (2008).
117. Ramirez JC, Da Cruz Moreira O. Assessing parasite load in Chagas disease patients by quantitative multiplex real-time PCR. In: *Methods in Molecular Biology.* 2019.
118. Mayta H, Romero YK, Pando A, Verastegui M, Tinajeros F, Bozo R, et al. Improved DNA extraction technique from clot for the diagnosis of Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 13(1), e0007024 (2019).
119. Ram JD, Cao L, Cruz-saavedra L, Hernandez C, Casta S, Mu M, et al. Pan-stage real-time PCR for quantitation of *Trypanosoma cruzi* parasitic loads in blood samples. *Int J Infect Dis.* , 0–7 (2022).
120. De Winne K, Büscher P, Luquetti AO, Tavares SBN, Oliveira RA, Solari A, et al. The *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA OligoC-TesT and *Trypanosoma cruzi* Kinetoplast DNA OligoC-TesT for diagnosis of Chagas disease: A multi-cohort comparative evaluation study. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(1), 55 (2014).
121. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized trial of Posaconazole and Benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 370(20), 1899–908 (2014).
122. Alonso-Vega C, Urbina JA, Sanz S, Pinazo MJ, Pinto JJ, Gonzalez VR, et al. New chemotherapy regimens and biomarkers for Chagas disease: The rationale and design of the TESEO study, an open-label, randomised, prospective, phase-2 clinical trial in the Plurinational State of Bolivia. *BMJ Open.* 11(12)(2021).

123. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop.* 103(3), 195–200 (2007).
124. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 3(4), e419 (2009).
125. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Jaramillo AMM, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(1), e931 (2011).
126. Ramírez JC, Cura CI, Da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical validation of quantitative real-time PCR methods for quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *J Mol Diagnostics.* 17(5), 605–15 (2015).
127. Ramírez JC, Torres C, Curto M de los A, Schijman AG. New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(12), 1–15 (2017).
128. James A, MacDonald J. Recombinase polymerase amplification: Emergence as a critical molecular technology for rapid, low-resource diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 15(11), 1475–89 (2015).
129. Thekisoe OMM, Coronel-Servian AM, Fukumoto S, Kawazu SI, Inoue N, Rodriguez C V., et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* infections from *Rhodnius pallescens* bugs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Am J Trop Med Hyg.* 82(5), 855–60 (2010).
130. Besuschio SA, Llano Murcia M, Benatar AF, Monnerat S, Cruz Mata I, Picado de Puig A, et al. Analytical sensitivity and specificity of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) kit prototype for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in human blood samples. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(7), 1–18 (2017).
131. Frank FM, Fernández MM, Taranto NJ, Cajal SP, Margni RA, Castro E, et al. Characterization of human infection by *Leishmania* spp. in the Northwest of Argentina: Immune response, double infection with *Trypanosoma cruzi* and species of *Leishmania* involves. *Parasitology.* 126(1), 31–9 (2003).
132. Ramirez LE, Lages-Silva E, Alvarenga-Franco F, Matos A, Vargas N, Fernandes O, et al. High prevalence of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* in opossums and triatomids in a formerly-endemic area of Chagas disease in Southeast Brazil. *Acta Trop.* 84(3), 189–98 (2002).
133. Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, D.C.: OPS; 1–172 p.2018.
134. Berenguer P, Llovet T, Tebar S, Muñoz C, Abras A, Ballart C, et al. Serological diagnosis of chronic Chagas disease: Is it time for a change? *J Clin Microbiol.* 54(6), 1566–72 (2016).
135. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, et al. Comparative evaluation of 11 commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol.* 52(7), 2506–12 (2014).

136. Egüez KE, Alonso-Padilla J, Terán C, Chipana Z, García W, Torrico F, et al. Rapid diagnostic tests duo as alternative to conventional serological assays for conclusive Chagas disease diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(4), 1–11 (2017).
137. Shah V, Ferrufino L, Gilman RH, Ramirez M, Saenza E, Malaga E, et al. Field evaluation of the InBios Chagas detect plus rapid test in serum and whole-blood specimens in Bolivia. *Clin Vaccine Immunol*. 21(12), 1645–9 (2014).
138. Angheben A, Buonfrate D, Cruciani M, Jackson Y, Alonso-Padilla J, Gascon J, et al. Rapid immunochromatographic tests for the diagnosis of chronic Chagas disease in at-risk populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(5), 1–15 (2019).
139. Mendicino D, Colussi C, Moretti E. Simultaneous use of two rapid diagnostic tests for the diagnosis of Chagas disease. *Trop Doct*. 49(1), 23–6 (2019).
140. Lozano D, Rojas Panozo L, Mendez S, Casellas A, Sanz S, Ortiz L, et al. Use of rapid diagnostic tests (RDTs) for conclusive diagnosis of chronic Chagas disease – field implementation in the Bolivian Chaco region. *PLoS Negl Trop Dis*. 13(12), e0007877 (2019).
141. Holguín A, Norman F, Martín L, Mateos ML, Chacón J, López-Vélez R, et al. Dried blood as an alternative to plasma or serum for *Trypanosoma cruzi* IgG detection in screening programs. *Clin Vaccine Immunol*. 20(8), 1197–202 (2013).
142. Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried blood spots - Preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *J Vis Exp*. 2015(97), 1–9 (2015).
143. Parker SP, Cubitt WD. The use of the dried blood spot sample in epidemiological studies. *J Clin Pathol*. 52(9), 633–9 (1999).
144. McClendon-Weary B, Putnick DL, Robinson S, Yeung E. Little to give, much to gain—What can you do with a Dried Blood Spot? *Curr Environ Heal Reports*. 7(3), 211–21 (2020).
145. Malone CJ, Nevis I, Fernández E, Sanchez A. A rapid review on the efficacy and safety of pharmacological treatments for Chagas disease. *Trop Med Infect Dis*. 6(3), 128 (2021).
146. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 373(14), 1295–306 (2015).
147. Pinazo MJ, Muñoz J, Posada E, López-Chejade P, Gállego M, Ayala E, et al. Tolerance of benznidazole in treatment of Chagas' disease in adults. *Antimicrob Agents Chemother*. 54(11), 4896–9 (2010).
148. Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic Chagas disease. *Clin Infect Dis*. 51(10), 6–12 (2010).
149. Pérez-Molina JA, Crespillo-Andújar C, Bosch-Nicolau P, Molina I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 39(9), 458–70 (2021).
150. Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 44(1), 29–37 (2002).
151. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, et al. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*. 52(3), 441–9 (2003).

152. Russomando G, De Tomassone MMC, De Guillen I, Acosta N, Vera N, Almiron M, et al. Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 59(3), 487–91 (1998).
153. Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: Why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106(6), 641–5 (2011).
154. Sulleiro E, Silgado A, Serre-Delcor N, Salvador F, de Oliveira MT, Moure Z, et al. Usefulness of real-time PCR during follow-up of patients treated with benznidazole for chronic Chagas disease: Experience in two referral centers in Barcelona. *PLoS Negl Trop Dis.* 14(2), 1–10 (2020).
155. Coura JR, De Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 97(1), 3–24 (2002).
156. Murcia L, Simón M, Carrilero B, Roig M, Segovia M. Treatment of infected women of childbearing age prevents congenital *Trypanosoma cruzi* infection by eliminating the parasitemia detected by PCR. *J Infect Dis.* 215(9), 1452–8 (2017).
157. Molina-Morant D, Fernández ML, Bosch-Nicolau P, Sulleiro E, Bangher M, Salvador F, et al. Efficacy and safety assessment of different dosage of benznidazol for the treatment of Chagas disease in chronic phase in adults (MULTIBENZ study): Study protocol for a multicenter randomized phase II non-inferiority clinical trial. *Trials.* 21(1), 1–10 (2020).
158. Gomes YM, Lorena V, Luquetti AO. Diagnosis of Chagas disease: what has been achieved? What remains to be done with regard to diagnosis and follow up studies? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104, 115–121 (2009).
159. Sales PA, Molina I, Murta SMF, Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Corrêa-Oliveira R, et al. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: A review. *Am J Trop Med Hyg.* 97(5), 1289–303 (2017).
160. Pinazo MJ, Thomas MC, Bua J, Perrone A, Schijman AG, Viotti RJ, et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 12(4), 479–96 (2014).
161. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, et al. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: The STOP-CHAGAS trial. *J Am Coll Cardiol.* 69(8), 939–47 (2017).
162. Torrico F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-vega C, Pinazo M, Schijman A, et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 18(4), 419–30 (2018).
163. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: Value and limitations. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104(SUPPL. 1), 122–35 (2009).
164. Alonso-Padilla J, Abril M, de Noya BA, Almeida IC, Angheben A, Jorge TA, et al. Target product profile for a test for the early assessment of treatment efficacy in Chagas disease patients: An expert consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 14(4), 1–10 (2020).

165. Torrico F, Gascón J, Barreira F, Blum B, Almeida IC, Alonso-vega C, et al. New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Infect Dis.* 21(8), 1129–40 (2021).
166. Álvarez MG, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JC, et al. New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: A pilot short-term follow-up study with adult patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(2), 833–7 (2016).
167. Rodrigues-dos-Santos Í, Melo MF, de Castro L, Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEAA, Silvestre de Sousa A, et al. Exploring the parasite load and molecular diversity of *Trypanosoma cruzi* in patients with chronic Chagas disease from different regions of Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 12(11), 1–19 (2018).
168. Hernández C, Cucunubá Z, Flórez C, Olivera M, Valencia C, Zambrano P, et al. Molecular diagnosis of Chagas disease in Colombia: Parasitic loads and discrete typing units in patients from acute and chronic phases. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(9), 1–20 (2016).
169. Loens K, Bergs K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 45(2), 421–5 (2006).
170. Francesca P, Patrizia PC, Franco G, Carlo B, Manca N. Performance evaluation of the automated NucliSens easyMAG nucleic acid extraction platform in comparison with QIAamp Mini kit from clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 64(2), 158–65 (2009).
171. Abras A, Ballart C, Llovet T, Roig C, Gutiérrez C, Tebar S, et al. Introducing automation to the molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: A comparative study of sample treatments, DNA extraction methods and real-time PCR assays. *PLoS One.* 13(4), 1–14 (2018).
172. Poma HR, Davies C. Comparación de la eficiencia de extracción de ácidos nucleicos utilizando distintos kits comerciales y empleando la qPCR. Efecto de las sustancias inhibitoras. *Rev Argent Microbiol.* 44, 144–9 (2012).
173. Wehrendt DP, Gómez-Bravo A, Ramirez JC, Cura C, Pech-May A, Ramsey JM, et al. Development and evaluation of a duplex TaqMan qPCR assay for detection and quantification of *Trypanosoma cruzi* infection in domestic and sylvatic reservoir hosts. *Parasites and Vectors.* 12(1), 1–9 (2019).
174. Rodríguez-Pérez MA, Danis-Lozano R, Rodríguez MH, Bradley JE. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect antibodies to *Onchocerca volvulus* on filter-paper blood spots: Effect of storage and temperature on antibody decay. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 93(5), 523–4 (1999).
175. Brutus L, Schneider D, Postigo J, Romero M, Santalla J, Chippaux JP. Congenital Chagas disease: Diagnostic and clinical aspects in an area without vectorial transmission, Bermejo, Bolivia. *Acta Trop.* 106(3), 195–9 (2008).
176. Lorca M, Contreras M, Salinas P, Guerra A, Raychaudhuri S. Evaluación de una prueba rápida para el diagnóstico de la infección por *Trypanosoma cruzi* en suero. *Parasitol latinoam.* 63(1/4), 29–33 (2008).
177. Bern C, Verastegui M, Gilman RH, LaFuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, et al. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis.* 49(11), 1667–74 (2009).

178. Reithinger R, Grijalva MJ, Chiriboga RF, De Noya BA, Torres JR, Pavia-Ruz N, et al. Rapid detection of *Trypanosoma cruzi* in human serum by use of an immunochromatographic dipstick test. *J Clin Microbiol.* 48(8), 3003–7 (2010).
179. Angheben A, Gobbi F, Buonfrate D, Tais S, Degani M, Anselmi M, et al. Notes on rapid diagnostic tests for chronic Chagas disease. *Bull la Soc Pathol Exot.* 110(1), 9–12 (2016).
180. Navarro M, Perez-Ayala A, Guionnet A, Perez-Molina JA, Navaza B, Estévez L, et al. Targeted screening and health education for chagas disease tailored to at-risk migrants in Spain, 2007 to 2010. *Eurosurveillance.* 16(38), 1–5 (2011).
181. Repetto EC, Zachariah R, Kumar A, Angheben A, Gobbi F, Anselmi M, et al. Neglect of a neglected disease in Italy: The challenge of access-to-care for Chagas disease in Bergamo area. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(9), 1–13 (2015).
182. Navarro M, Berens-Riha N, Hohnerlein S, Seiringer P, Von Saldern C, Garcia S, et al. Cross-sectional, descriptive study of Chagas disease among citizens of Bolivian origin living in Munich, Germany. *BMJ Open.* 7(1), 1–9 (2017).
183. Da Costa-Demaurex C, Cárdenas MT, Aparicio H, Bodenmann P, Genton B, D'Acromont V. Screening strategy for Chagas disease in a non-endemic country (Switzerland): A prospective evaluation. *Swiss Med Wkly.* 149(13–14), 1–7 (2019).
184. Ayorinde AA, Porteous T, Sharma P. Screening for major diseases in community pharmacies: A systematic review. *Int J Pharm Pract.* 21(6), 349–61 (2013).
185. Fernandez-Lopez L, Reyes-Urueña J, Conway A, Saz J, Morales A, Quezadas J, et al. The contribution of HIV point-of-care tests in early HIV diagnosis: community-based HIV testing monitoring in Catalonia, 1995 to 2018. *Eurosurveillance.* 25(43), 1–11 (2020).
186. Ibañez-Sanz G, Milà N, Vidal C, Rocamora J, Moreno V, Sanz-Pamplona R, et al. Positive impact of a faecal-based screening programme on colorectal cancer mortality risk. *PLoS One.* 16(6 June), 1–14 (2021).
187. Echeverría LE, Marcus R, Novick G, Sosa-Estani S, Ralston K, Zaidel EJ, et al. WHF IASC roadmap on chagas disease. *Glob Heart.* 15(1), 1–31 (2020).
188. Avaria A, Gómez i Prat J. Si tengo Chagas es mejor que me muera. El desafío de incorporar una aproximación sociocultural a la atención de personas afectadas por la enfermedad de Chagas. *Enferm emerg.* 10(Supl 1), 40–5 (2008).
189. Velarde-Rodriguez M, Avaria-saavedra A, Gomez-i-Prat J, Jackson Y, De Oliveira Junior AW, Camps-carmona B, et al. Need of comprehensive health care for *T. cruzi* infected immigrants in Europe. *Rev Soc Bras Med Trop.* 42(2), 92–5 (2009).
190. Avaria A, Ventura-Garcia L, Sanmartino M, Van der Laat C. Population movements, borders, and chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 116(1), 1–8 (2021).
191. Requena-Méndez A, Bussion S, Aldasoro E, Jackson Y, Angheben A, Moore D, et al. Cost-effectiveness of Chagas disease screening in Latin American migrants at primary health-care centres in Europe: a Markov model analysis. *Lancet Glob Heal.* 5(4), e439–47 (2017).
192. Hoomans T, Severens JL. Economic evaluation of implementation strategies in health care. *Implement Sci.* 9(168)(2014).

193. di Girolamo C, Bodini C, Marta BL, Ciannameo A, Cacciatore F. Chagas disease at the crossroad of international migration and public health policies: Why a national screening might not be enough. *Eurosurveillance*. 16(37), 19965 (2011).
194. Castaldo M, Cavani A, Segneri MC, Costanzo G, Mirisola C, Marrone R. Anthropological study on Chagas Disease: Sociocultural construction of illness and embodiment of health barriers in Bolivian migrants in Rome, Italy. *PLoS One*. 15(10 October), 1–14 (2020).
195. Fontana Sierra L. Pandemic and rearticulation of social relations. *Perifèria Rev d'investigació i Form en Antropol*. 25(2), 101 (2020).

9

ANEXO

9. ANEXO

A continuación se exponen trabajos publicados que no forman parte de los resultados de esta Tesis Doctoral, pero se encuentran relacionados con el tema de investigación de la presente Tesis:

- *Intra-Discrete Typing Unit TcV Genetic Variability of Trypanosoma cruzi in Chronic Chagas' Disease Bolivian Immigrant Patients in Barcelona, Spain.*

de Oliveira MT, Sulleiro E, da Silva MC, Silgado A, de Lana M, da Silva JS, Molina I, Marin-Neto JA. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. Mayo, 2021. doi: 10.3389/fcvm.2021.665624

- *Quantification of parasite burden of Trypanosoma cruzi and identification of Discrete Typing Units (DTUs) in blood samples of Latin American immigrants residing in Barcelona, Spain.*

Tavares de Oliveira M, Sulleiro E, Silgado Gimenez A, de Lana M, Zingales B, Santana da Silva J, Marin-Neto JA, Molina I. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Junio, 2020. doi: 10.1371/journal.pntd.0008311

- *Contributions of molecular techniques in the chronic phase of Chagas disease in the absence of treatment.*

Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, Moure Z, Sánchez-Montalvá A, Aznar ML, Goterris L, Molina I, Pumarola T. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Febrero, 2020. doi: 10.1016/j.eimc.2020.01.003

- *Usefulness of real-time PCR during follow-up of patients treated with Benznidazole for chronic Chagas disease: Experience in two referral centers in Barcelona.*

Sulleiro E, Silgado A, Serre-Delcor N, Salvador F, Tavares de Oliveira M, Moure Z, Sao-Aviles A, Oliveira I, Treviño B, Goterris L, Sánchez-Montalvá A, Pou D, Molina I, Pumarola T. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. Febrero, 2020. doi: 10.1371/journal.pntd.0008067

- *Serum IL-10 Levels and Its Relationship with Parasitemia in Chronic Chagas Disease Patients.*

Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Sulleiro E, Franco-Jarava C, Sao Avilés A, Bosch-Nicolau P, Moure Z, Silgado A, Molina I. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. Enero, 2020. doi: 10.4269/ajtmh.19-0550

