



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original breve

## Evaluación de estuches comerciales para el diagnóstico inmunológico y molecular de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas de Venezuela



Mercedes Viettri<sup>a</sup>, María Lares<sup>a</sup>, Mehudy Medina<sup>b</sup>, Leidi Herrera<sup>c</sup> y Elizabeth Ferrer<sup>a,d,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Investigaciones Biomédicas «Dr. Francisco J. Triana Alonso» (BIOMED), Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

<sup>b</sup> Laboratorio de Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, Dirección General de Salud Ambiental, Ministerio del Poder Popular para la Salud, Maracay, Venezuela

<sup>c</sup> Instituto de Zoología y Ecología Tropical (IZET), Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela (UCV), Caracas, Venezuela

<sup>d</sup> Departamento de Parasitología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo Sede Aragua, Maracay, Venezuela

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 28 de junio de 2020

Aceptado el 11 de septiembre de 2020

On-line el 24 de octubre de 2020

#### Palabras clave:

Enfermedad de Chagas

Diagnóstico

PCR

ELISA

Estuches comerciales

### R E S U M E N

**Introducción:** La sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico para la enfermedad de Chagas dependen en gran parte de los antígenos y las dianas utilizadas y de la respuesta inmunológica y las características de la infección de la población donde se aplica, de allí la necesidad de la evaluación de las técnicas de diagnóstico disponibles en un área determinada, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar dos estuches comerciales para el diagnóstico inmunológico y molecular de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas de Venezuela.

**Métodos:** Se evaluaron los estuches: Chagas ELISA IgG + IgM<sup>®</sup> y Speed Oligo Chagas<sup>®</sup> (Vircell<sup>®</sup>, Granada, España). Se valoraron con 129 muestras (35 de pacientes en fase aguda, 33 en fase crónica, 31 de pacientes con otras enfermedades y 30 de individuos sanos). Se compararon los resultados con los obtenidos en las pruebas convencionales ELISA y PCR-ADN satélite de *Trypanosoma cruzi*.

**Resultados:** Con Chagas ELISA IgG + IgM<sup>®</sup> se obtuvo una sensibilidad de 94,1% y especificidad de 93,4%, con Speed Oligo Chagas<sup>®</sup> se obtuvo una sensibilidad de 92,6% y especificidad de 100%, valores similares a los obtenidos con ELISA y PCR-ADNsat convencionales.

**Conclusión:** La sensibilidad y especificidad de los estuches comerciales evaluados los hacen adecuados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas de Venezuela.

© 2020 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

## Evaluation of commercial kits for the immunological and molecular diagnosis of Chagas disease in endemic areas of Venezuela

### A B S T R A C T

**Introduction:** The sensitivity and specificity of diagnostic techniques for Chagas disease depend largely on the antigens and targets used and on the immune response and characteristics of the infection of the population where it is applied, hence the need for evaluation of the diagnostic techniques available in a given area. So, the objective of this work was to evaluate two commercial kits for the immunological and molecular diagnosis of Chagas disease in endemic areas of Venezuela.

**Methods:** The evaluated kits were: Chagas ELISA IgG + IgM<sup>®</sup> and Speed Oligo Chagas<sup>®</sup> (Vircell<sup>®</sup>, Granada, Spain). They were evaluated with 129 samples (35 from patients in the acute phase, 33 in the chronic phase, 31 from patients with other diseases, and 30 from healthy individuals). The results were compared with those obtained in the conventional ELISA and PCR-satellite DNA tests for *Trypanosoma cruzi*.

#### Keywords:

Chagas disease

Diagnosis

PCR

ELISA

Commercial kits

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: elizabeth.ferrer@gmail.com (E. Ferrer).

**Results:** With Chagas ELISA IgG + IgM<sup>®</sup> a sensitivity of 94.1% and specificity of 93.4% were obtained, with Speed Oligo Chagas<sup>®</sup> a sensitivity of 92.6% and specificity of 100% were achieved, values similar to those showed by conventional ELISA and satDNA-PCR.

**Conclusion:** The sensitivity and specificity of the commercial kits evaluated make them suitable for the diagnosis of Chagas disease in endemic areas of Venezuela.

© 2020 Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

## Introducción

La enfermedad de Chagas está causada por el hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) y se transmite a mamíferos a través del contacto con heces infectadas de triatominos. La enfermedad presenta una fase aguda, con abundante parasitemia, seguida de una recuperación o del establecimiento de una fase crónica, con una parasitemia leve y una clínica que va desde asintomática hasta una enfermedad con síntomas cardiológicos, digestivos y neurológicos con riesgo de fallecimiento. Actualmente, entre 6 y 7 millones de personas tienen la enfermedad y 25 millones están en riesgo de infección<sup>1</sup>. En Venezuela en los últimos años se han descrito aumentos en la incidencia y prevalencia<sup>2-5</sup>, comunicaciones de casos agudos<sup>6</sup>, aumento de seropositivos en bancos de sangre<sup>7</sup> y brotes de transmisión oral<sup>8-10</sup>.

El diagnóstico se realiza generalmente por métodos parasitológicos e inmunológicos. Las técnicas parasitológicas pueden tener baja sensibilidad cuando la carga parasitaria es baja. Aunque muchas de las técnicas que se están utilizando actualmente para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas tienen buena especificidad, estas podrían presentar algunas reacciones cruzadas con otros parásitos relacionados, siendo muy importante su evaluación sobre todo en áreas coendémicas para enfermedad de Chagas/leishmaniasis. La técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) detecta secuencias específicas de ADN del parásito, siendo útil para el diagnóstico. Aunque también tiene algunas limitaciones, tiene ventajas, en casos agudos, transmisión congénita, inmunodeficiencias y en la evaluación del tratamiento<sup>11,12</sup>.

Existe consenso en recomendar dos técnicas, sugiriéndose una tercera prueba en caso de discrepancia<sup>13</sup>. En Venezuela, el diagnóstico se realiza comúnmente en centros públicos y privados utilizando principalmente pruebas comerciales y la verificación se realiza generalmente por Laboratorios de Referencia, dándose el caso de resultados discrepantes en pacientes diagnosticados en estos centros, con respecto a los de los Laboratorios de Referencia<sup>7</sup>.

Debido a esta problemática el propósito del trabajo fue evaluar dos estuches comerciales (ELISA y PCR, Vircell<sup>®</sup>, Granada, España), comparando la eficacia diagnóstica con el ELISA y PCR caseros de nuestro laboratorio (Laboratorio de Referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la zona Central de Venezuela).

## Métodos

Se evaluaron 129 muestras de sangre y suero: 35 de pacientes en fase aguda, 33 en fase crónica, 31 de pacientes con otras enfermedades (leishmaniasis visceral, n = 11, leishmaniasis cutánea, n = 10, malaria, n = 5, y toxoplasmosis, n = 5) y 30 de individuos sanos. Todas las muestras fueron cedidas por dos Laboratorios de Referencia para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas de la zona Central de Venezuela y estaban confirmadas previamente mediante diagnóstico clínico, métodos parasitológicos (extendido de sangre coloreado, xenodiagnóstico y hemocultivo) e inmunodiagnóstico mediante ensayo inmunoenzimático (ELISA), hemaglutinación indirecta e inmunofluorescencia indirecta. El protocolo de trabajo

fue aprobado por el Comité de Bioética del BIOMED-UC y todos los individuos habían firmado el consentimiento informado aceptando el uso de sus muestras para diagnóstico e investigación.

Se realizó un ELISA casero utilizando el antígeno de Maeckelt de *T. cruzi*, como ha sido descrito<sup>14</sup> y el ELISA comercial de Chagas ELISA IgG + IgM<sup>®</sup> (Vircell<sup>®</sup>, Granada, España) siguiendo las instrucciones del fabricante<sup>15</sup>.

A partir de las muestras de sangre detalladas anteriormente, se efectuó la extracción de ADN, utilizando la resina Chelex<sup>®</sup> 100 (BioRad, Hercules CA, EE. UU.) como se ha descrito<sup>14</sup>. Posteriormente, se realizó la prueba de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi*<sup>16</sup>, empleando los cebadores: TcZ1 (directo) 5'-CGAGCTCTTGCCACACGGGTGCT-3' y TcZ2 (reverso) 5'-CCTCAAGCAGCGGATAGTTCAGG-3'. Las reacciones de amplificación y observación de los resultados por electroforesis en geles de agarosa se realizaron según los protocolos descritos<sup>14</sup>. Además, se realizó la prueba de PCR para la detección de ADN satélite de *T. cruzi* y el revelado del producto según el protocolo descrito por la casa comercial *Speed Oligo Chagas*<sup>®</sup> (Vircell<sup>®</sup>, Granada, España)<sup>15</sup>.

Se compararon los resultados obtenidos de las pruebas de ELISA y PCR, caseras y comerciales (Vircell<sup>®</sup>, Granada, España). Los resultados se ordenaron en tablas de contingencia y se calcularon los índices diagnósticos, sensibilidad y especificidad y la concordancia con el diagnóstico de referencia (*gold standar* o estándar de diagnóstico). El diagnóstico de referencia se estableció como un diagnóstico compuesto por varias pruebas (parasitológicas e inmunológicas) siguiendo los criterios de la OMS<sup>13</sup> y OPS<sup>17,18</sup>. Se determinó el índice *kappa* calculado mediante el programa Stat Xact 8.0 para Windows para estimar la concordancia entre los resultados.

## Resultados

Las muestras positivas de fase aguda dieron mejores resultados en todas las pruebas (inmunológicas y moleculares, tanto caseras como comerciales), que las muestras positivas de fase crónica. Solo se observaron 3 falsos positivos en el caso del ELISA casero (2 correspondieron a individuos con leishmaniasis visceral y uno correspondió a un individuo sano) y 4 en el ELISA comercial (2 correspondieron a los mismos individuos con leishmaniasis visceral y 2 correspondieron a individuos sanos, uno de ellos, el positivo al ELISA casero). En las técnicas moleculares (PCR), tanto la casera como la comercial, no se observaron falsos positivos (tabla 1 y tabla suplementaria 1 del Anexo Appendix B).

Por otro lado, en cuanto a los índices diagnósticos, los mejores valores de sensibilidad se obtuvieron en la técnica de ELISA, tanto casero como comercial (94,1%). Por el contrario, la especificidad fue mayor en la técnica de PCR, tanto la casera como la comercial (100%) (tabla 2). Se observó una concordancia elevada entre todas las pruebas evaluadas y el diagnóstico de referencia, siendo la mayor concordancia con la PCR comercial (96%) y la menor con el ELISA comercial (94%) por lo que se obtuvieron índices *kappa* de 0,92 y 0,88, respectivamente. Estos índices *kappa* señalan una concordancia casi perfecta (tabla 2).

**Tabla 1**  
Detección de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* mediante ELISA casero y ELISA comercial y detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR casero y PCR comercial, en muestras de pacientes con enfermedad de Chagas en fase aguda y crónica, pacientes con otras enfermedades parasitarias (heterólogos) e individuos sanos

Muestras	Técnicas			
	ELISA casero*	ELISA comercial*	PCR casero*	PCR comercial*
Pacientes fase aguda	33/35 (94,2)	34/35 (97,1)	34/35 (97,1)	33/35 (94,2)
Pacientes fase crónica	31/33 (93,9)	30/33 (90,9)	28/33 (84,8)	30/33 (90,9)
Pacientes heterólogos	2/31 (6,5)	2/31 (6,5)	0/31 (0)	0/31 (0)
Leishmaniasis visceral	2/11	2/11	0/11	0/11
Leishmaniasis cutánea	0/10	0/10	0/10	0/10
Malaria	0/5	0/5	0/5	0/5
Toxoplasmosis	0/5	0/5	0/5	0/5
Individuos sanos	1/30 (3,3)	2/30 (6,7)	0/30 (0)	0/30 (0)

\* Muestras positivas/muestras analizadas (% muestras positivas).

**Tabla 2**  
Índices diagnósticos y concordancia de las pruebas de ELISA casero, ELISA comercial, PCR casero y PCR comercial para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

	Técnicas			
	ELISA casero % (IC 95%)	ELISA comercial % (IC 95%)	PCR casero % (IC 95%)	PCR comercial % (IC 95%)
Sensibilidad	94,1 (85,8-97,7)	94,1 (85,8-97,7)	91,2 (82,1-95,9)	92,6 (83,9-96,8)
Especificidad	95,1 (86,5-98,3)	93,4 (84,3-97,4)	100 (94,1-100)	100 (94,1-100)
Concordancia	95%	94%	95%	96%
Índice Kappa	0,89 (0,81-0,97)	0,88 (0,79-0,96)	0,91 (0,83-0,98)	0,92 (0,86-0,99)

## Discusión

La enfermedad de Chagas en Venezuela (controlada en el pasado), se considera actualmente una de las muchas enfermedades reemergentes, en la situación de salud altamente deteriorada en el país<sup>4</sup>. En los últimos años se ha venido presentando un aumento de la incidencia y prevalencia (demostrado por los últimos estudios epidemiológicos<sup>2,3,5</sup>), la comunicación de casos agudos<sup>6</sup>, el aumento de seropositivos en bancos de sangre<sup>7</sup> y numerosos brotes por transmisión oral<sup>8-10</sup>. La prevalencia real de la enfermedad de Chagas en el país es muy difícil de estimar por la irregularidad y múltiples problemas con el Programa Nacional de Control de la enfermedad de Chagas. Algunos estudios de ciertas zonas del país describen seroprevalencias entre 10-12%<sup>9</sup>. Es por ello que, en este contexto, donde existen diferencias entre los resultados de los diversos centros de diagnóstico y los de los laboratorios de referencia<sup>5,7</sup>, se hace necesaria evaluación y comparación de la capacidad diagnóstica de las distintas técnicas empleadas.

Debido a los posibles problemas de sensibilidad y especificidad de algunas pruebas en ciertos escenarios, la OMS/OPS recomiendan para la confirmación de los casos agudos el uso de pruebas parasitológicas/moleculares y en pacientes con sospecha de infección crónica el uso del «estándar de diagnóstico» (al menos dos pruebas de principios distintos y una tercera técnica ante casos de discrepancia). Además, se aconseja el uso de ELISA en los estudios poblacionales sobre la prevalencia de la enfermedad de Chagas, y usar ELISA (estuches altamente sensibles) para el tamizaje de la infección crónica por *T. cruzi* en los servicios de banco de sangre<sup>17,18</sup>.

En este trabajo se evaluaron dos estuches comerciales; Chagas ELISA IgG + IgM<sup>®</sup> (Vircell<sup>®</sup>, Granada, España) y *Speed Oligo Chagas*<sup>®</sup> (Vircell<sup>®</sup>, Granada, España) y se compararon con el ELISA y la PCR caseras que se realizan en el laboratorio. La principal diferencia entre las pruebas está en que el ELISA casero emplea el antígeno de Maekelt de *T. cruzi* (extracto proteico total del parásito), mientras que el ELISA comercial contiene los antígenos recombinantes ampliamente valorados para diagnóstico; FRA, B13 y MACH (PEP2

TcD TcE y SAPA)<sup>15</sup>. Sin embargo, no hubo diferencia en la sensibilidad y la ligera diferencia en especificidad no fue significativa. Por otro lado, en cuanto al diagnóstico molecular la diana de amplificación es la misma; ADN satélite de *T. cruzi* tanto para la PCR casera como la comercial, la diferencia está en el método de detección, que en la PCR casera es por electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, mientras que, en la PCR comercial es por hibridación del producto de PCR en una tira reactiva, lo que quizás hizo a esta última ligeramente más sensible (aunque no significativamente) que la PCR casera. Por otro lado, la especificidad de ambas PCR fue la misma, lo cual era de esperar al tener la misma diana de amplificación.

Existen estudios publicados de valoración de estuches comerciales donde la mayoría de los estuches presentan sensibilidad por encima de 98% y muy pocos por debajo de ese valor. En cuanto a la especificidad, la mayoría presenta valores mayores al 96-97%, revelando los estuches con antígenos recombinantes mejores valores en cuanto a especificidad<sup>17-20</sup>. En el presente trabajo, entre los falsos positivos, 2 correspondieron a individuos con leishmaniasis visceral y 2 a individuos sanos (quienes quizás pudieron haber tenido alguna infección inaparente o debido a memoria inmunológica por infecciones pasadas y superadas, aunque no consta en sus historias clínicas). Aunque para la especificidad se toma en cuenta el total de muestras que deberían ser negativas, es necesario hacer estudios posteriores con mayor número de muestras de leishmaniasis en zonas coendémicas, ya que incluso se ha comunicado la presencia de coinfección en estas zonas<sup>21,22</sup>.

Es muy importante tener en cuenta el contexto epidemiológico en el cual se evalúan las técnicas de diagnóstico, ya que por ejemplo, en este trabajo se muestra que la serología detecta un mayor número de casos en fase aguda que en fase crónica, no siendo lo común en la mayoría de las situaciones epidemiológicas. Esto podría explicarse por la situación sanitaria actual de Venezuela, ya que muchos estudios muestran que las infecciones metaxénicas reemergentes, controladas en el pasado, han aumentado su incidencia y prevalencia<sup>2-6</sup>. Estos datos sugieren que en Venezuela la

transmisión de *T. cruzi* es altamente activa, y por ello no se observa diferencia entre las dos fases.

Por otro lado, se ha descrito la persistencia del parásito en pacientes considerados en fase crónica y fallos en tratamiento, donde se observa persistencia parasitaria aún varios años después de tratados y de que los síntomas de fase aguda habían desaparecido<sup>23</sup>. El seguimiento de los brotes de enfermedad de Chagas por transmisión oral ha mostrado un 70% de persistencia de la infección, seis años después de tratamiento parasiticida<sup>9</sup>. Esto es compatible con lo reflejado en los resultados de PCR en fase crónica, donde el valor de sensibilidad es similar al de la fase aguda, lo cual no es común en la mayoría de los casos, donde la sensibilidad de la PCR para la amplificación de ADN satélite (una de las dianas más utilizadas a nivel mundial) está alrededor de 50% en fase crónica<sup>24</sup>. Por lo que, en esta situación, la definición de fase aguda y fase crónica se hace complicada. De allí la necesidad de evaluar las técnicas de diagnóstico en cada contexto particular.

La evaluación del estuche comercial de ELISA Vircell® solo se ha publicado en un trabajo de grado<sup>25</sup> y en un estudio de la OMS para la validación de estándares biológicos internacionales<sup>26</sup>, obteniendo valores de sensibilidad y especificidad similares a los obtenidos en el presente trabajo. No existen publicaciones sobre el estuche *Speed Oligo Chagas*® (Vircell®, Granada, España).

Los índices diagnósticos de los estuches comerciales evaluados resultaron ser similares a los obtenidos por las pruebas caseras y son adecuados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en zonas endémicas de Venezuela. En el caso de *Speed Oligo Chagas*® (Vircell®, Granada, España) se evita el uso de sustancias peligrosas como bromuro de etidio en la PCR convencional, la cual es utilizada en algunos centros de referencia de Venezuela.

## Financiación

Este trabajo fue financiado por: Proyecto DIPISA-PG-2017-004, Universidad de Carabobo.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.eimc.2020.09.007](https://doi.org/10.1016/j.eimc.2020.09.007).

## Bibliografía

- WHO. 2020. Chagas Disease (American trypanosomiasis) Fact sheet. World Health Organization, Geneva. [consultado 28 Jun 2020]. Disponible en: [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)).
- Bonfante-Cabarcas R, Rodríguez-Bonfante C, Vilma BO, García D, Saldivia AM, Aldama E, et al. Seroprevalence for *Trypanosoma cruzi* infection and associated factors in an endemic area of Venezuela. *Cad. Saude Pública.* 2011;27:1917–29.
- Carrasco H, Segovia M, Londoño J, Ortegoza J, Rodríguez M, Martínez C. *Panstrongylus geniculatus* and four other species of triatomine bug involved in the *Trypanosoma cruzi* enzootic cycle: high risk factors for Chagas' disease transmission in the metropolitan district of Caracas. *Venezuela. Parasit Vectors.* 2014;7:602–17.
- Grillet ME, Hernández-Villena JV, Llewellyn MS, Paniz-Mondolfi AE, Tami A, Vincenti-Gonzalez MF, et al. Venezuela's humanitarian crisis, resurgence of vector-borne diseases, and implications for spillover in the region. *Lancet Infect Dis.* 2019;19:e149–61.
- Añez N, Crisante G, Rojas A, Segninib S, Espinoza-Álvarez O, Teixeira MMG. Update on Chagas disease in Venezuela during the period 2003–2018. *Acta Trop.* 2020;203:105310.
- Morocoima A, Tineo E, Ferrer E, Herrera L, Nuñez M. Chagas disease in Anzoátegui state Venezuela: Record of an acute case and parasitological and molecular characterization of the isolate. *Bol. Mal. Salud Amb.* 2008;48:121–6.
- Díaz Bello Z, Zavala-Jaspe R, Díaz-Villalobos M, Mauriello L, Maekelt A, Alarcón de Noya B. Diagnóstico confirmatorio de anticuerpos anti-*Trypanosoma cruzi* en donantes referidos por bancos de sangre en Venezuela. *Invest Clin.* 2008;49:141–50.
- Alarcón de Noya B, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, et al. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect. Dis.* 2010;201:1308–15.
- Alarcón de Noya BA, Díaz-Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Murillo L, Muñoz-Calderón A, et al. Update on oral Chagas disease outbreaks in Venezuela: epidemiological, clinical and diagnostic approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;110:377–86.
- Noya BA, Pérez-Chacón G, Díaz-Bello Z, Dickson S, Muñoz-Calderón A, Hernández C, et al. Description of an oral Chagas disease outbreak in Venezuela, including a vertically transmitted case. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112:569–71.
- Ferrer E. Técnicas moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Revista Saber UDO.* 2015;27:359–71.
- Schijman AG. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* 2018;184:59–66.
- Organización Mundial de la Salud. Control de la enfermedad de Chagas. Segundo Informe del Comité de Expertos de la OMS. Serie de Informes Técnicos 905, Ginebra, 2002.
- Ferrer E, Lares M, Vietri M, Medina M. Comparación entre técnicas inmunológicas y moleculares para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31:277–82.
- Diagnóstico de Enfermedades infecciosas. Kits listos para uso. Catálogo internacional de Productos Vircell Microbiologists. [www.vircell.com](http://www.vircell.com). [consultado 28 Jun 2020]. Disponible en: [https://www.vircell.com/media/filer\\_public/88/5f/885f34fd-c350-46db-a52c-c0ac63ec95c1/vircell-catalogo-productos-2018-es-w.pdf](https://www.vircell.com/media/filer_public/88/5f/885f34fd-c350-46db-a52c-c0ac63ec95c1/vircell-catalogo-productos-2018-es-w.pdf).
- Moser D, Kirchhoff L, Donelson J. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1989;27:1477–82.
- Organización Panamericana de la Salud. Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Washington, DC: OPS; 2018. [consultado 28 Jun 2020]. Disponible en: <http://iris.paho.org>.
- Organización Panamericana de la Salud. Síntesis de evidencia: Guía para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Panam Salud Pública.* 2020;44:e28. <https://doi.org/10.26633/RPSP.2020.28>.
- Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, et al. Comparación de técnicas serológicas convencionales y no convencionales para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas importada en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010;28:284–93.
- Guzmán-Gómez D, López-Monteon A, de la Soledad Lagunes-Castro M, Álvarez-Martínez C, Hernández-Lutzon MJ, Dumonteil E, et al. Highly discordant serology against *Trypanosoma cruzi* in central Veracruz, Mexico: role of the antigen used for diagnostic. *Parasit Vectors.* 2015;8:466.
- Vietri M, Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A, Reyes J, Lares M, et al. Molecular diagnosis of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in domestic, peridomestic and wild mammals of Venezuelan co-endemic areas. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 2018;14:123–30.
- Vietri M, Herrera L, Aguilar CM, Morocoima A, Reyes J, Lares M, et al. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi*/*Leishmania* spp. coinfection in mammals of Venezuelan co-endemic areas. *J Vector Borne Dis.* 2019;56:252–62.
- Añez N, Crisante G, Caraballo F, Delgado W, Parada H. *Trypanosoma cruzi* persistence at oral inflammatory foci in chronic chagasic patients. *Acta Trop.* 2011;117:207–11.
- Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, et al. Contributions of molecular techniques in the chronic phase of Chagas disease in the absence of treatment. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2020;S0213–005X:30004–5.
- Caicedo RA. Evaluación del rendimiento diagnóstico de técnicas ELISA para la enfermedad de Chagas en Colombia. Trabajo de Grado para Maestría en epidemiología Facultad de Medicina, Universidad del Rosario Colombia. 2017.
- Otani M, Hockley J, Guzmán Bracho C, Rijpkema S, Luquetti AO, Duncan R, et al. Evaluation of two International Reference Standards for antibodies to *Trypanosoma cruzi* in a WHO collaborative study Expert Committee on Biological Standardization. WHO/BS/2011.2181. World Health Organization WHO. 2011.