

COMPARACIÓN DE LA DETECCIÓN DE *Trypanosoma cruzi* EN MUESTRAS DE SUERO Y SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE QPCR EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS

Mendoza Santiago¹, Ramírez Diana A.¹, Jaimes Silvia Y.¹, Naranjo Luis A.¹, Chaparro William F.², González Clara I.², Díaz Martha L.²

1. Semillero de Investigación en Inmunogenética (SIGE), Escuela de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

2. Grupo Inmunología y Epidemiología Molecular (GIEM), Escuela de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas sigue siendo un importante problema de salud pública en regiones endémicas, donde la detección temprana del parásito es crucial para su manejo. En la actualidad, la qPCR ha sido ampliamente utilizada para el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad en muestras de sangre periférica. Sin embargo, la preparación de esta muestra involucra la adición de reactivos, lo que confiere un mayor costo y limita el uso del método. Por otra parte, las muestras de suero presentan mayor disponibilidad en laboratorios convencionales, por lo cual se hace necesario estudiar su viabilidad como muestra alternativa. Este estudio se propuso comparar la detección de ADN satelital de *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en muestras de suero y sangre periférica de pacientes seropositivos mediante qPCR. Se analizaron muestras provenientes de 30 pacientes. El ADN de suero se extrajo utilizando el kit Quick-DNA/RNA Viral MagBead, mientras que el ADN de sangre periférica se obtuvo mediante Salting out. Se realizó qPCR con SYBR Green, y se validaron los resultados con una curva de calibración y la amplificación del gen GAPDH como control interno. Se detectó ADN satelital de *T. cruzi* en el 30% (n=9) de las muestras de suero. El análisis de los valores de Ct para *T. cruzi* no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre las matrices de sangre periférica y suero. Estos hallazgos demuestran la viabilidad de la muestra de suero para la detección del parásito y sugieren un papel complementario en el diagnóstico de la enfermedad, así como el monitoreo de los pacientes en fase crónica.

Palabras clave

Enfermedad de Chagas, PCR en tiempo real, *Trypanosoma cruzi*, ADN satelital.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), constituye un problema de salud pública en América Latina [1]. La Organización

Mundial de la Salud (OMS), estima que más de seis millones de personas están infectadas con *T. cruzi* en todo el mundo y la mayoría de los casos se concentran en América Latina [2], principalmente en las áreas rurales y semiurbanas. Allí, la enfermedad supone una elevada carga social y económica en quienes la padecen.

La enfermedad se presenta en dos fases clínicas: la fase aguda y la fase crónica. Durante la fase aguda, que ocurre en las semanas o meses posteriores a la infección, los pacientes presentan una alta carga parasitaria en sangre [3], lo que facilita la detección del parásito mediante métodos directos como la microscopía o pruebas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [4]. Sin embargo, en esta etapa la mayoría de los casos pasan desapercibidos y no son diagnosticados, lo que permite que la infección progrese hacia la fase crónica [5]. En esta última fase, que puede durar décadas, la carga parasitaria disminuye considerablemente y se vuelve intermitente, lo que dificulta su detección mediante métodos directos, por lo que se utilizan métodos serológicos en los que se detectan los anticuerpos formados contra el parásito [6]. Esta situación plantea un desafío considerable para el diagnóstico y el manejo clínico de los pacientes en la fase crónica, ya que la confirmación de la infección sigue siendo crucial para guiar las decisiones terapéuticas [7,8,9].

En las últimas dos décadas, la PCR en tiempo real (qPCR) se ha posicionado como la técnica de referencia para la detección de *T. cruzi* en la fase aguda de la ECh. Esta metodología permite la detección de ADN del parásito incluso en muestras con bajas cargas parasitarias, superando las limitaciones de métodos serológicos y de microscopía [10]. Se ha determinado que en pacientes en fase aguda presenta una especificidad y sensibilidad de 88-100%, mientras que en fase crónica es de 60-80% [11,7]. Tradicionalmente, las muestras de sangre periférica han sido la matriz biológica de elección para la qPCR en el diagnóstico de la ECh [12], ya que ofrecen un acceso directo al parásito en el torrente sanguíneo. No obstante, la extracción de ADN de sangre periférica implica procesos laboriosos y costosos, como la adición de buffer de clorhidrato de guanidina-EDTA, reactivo que preserva el ADN del parásito y aumenta la sensibilidad de la qPCR [13]. De esta forma, la necesidad de condiciones de almacenamiento controladas junto al tratamiento con este reactivo, limita su uso en áreas con recursos limitados y en laboratorios de atención primaria [14].

Para abordar estas limitaciones y explorar nuevas posibilidades diagnósticas, el suero ha sido propuesto como una opción viable para la detección de ADN de *T. cruzi* mediante qPCR. El suero, además de ser utilizado en una variedad de pruebas diagnósticas, presenta una recolección, conservación y extracción de ADN menos exigentes que la sangre periférica [15,16,17]. Sin embargo, la viabilidad del suero para la detección de *T. cruzi* mediante qPCR no ha sido ampliamente evaluada. Aunque algunos estudios preliminares sugieren que el suero podría ser una alternativa prometedora, es necesario realizar comparaciones directas con la sangre periférica para determinar su precisión diagnóstica.

JUSTIFICACIÓN

En este contexto, surge la necesidad de explorar alternativas que simplifiquen el diagnóstico y proporcionen una mejor comprensión de la dinámica del parásito durante la fase crónica de la enfermedad. En este sentido, comparar los resultados de qPCR en muestras de suero frente a las de sangre periférica permitirá evaluar su eficiencia en la detección del parásito y entender mejor su comportamiento en esta fase [18]. Si el suero se confirma como una matriz adecuada, podría establecerse su uso en el diagnóstico, facilitando la implementación de pruebas moleculares en áreas con recursos limitados y mejorando el acceso al tratamiento.

OBJETIVO GENERAL

Comparar la detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de suero y sangre periférica mediante qPCR en pacientes seropositivos para la enfermedad de Chagas en fase crónica.

Objetivo específico

Evaluar la viabilidad del suero como muestra alternativa en la detección de ADN de *Trypanosoma cruzi* mediante qPCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio involucró 30 pacientes seropositivos para ECh, provenientes de diferentes regiones endémicas de Santander [19]. Las muestras de suero seleccionadas cumplieron con los siguientes criterios: (I) Muestras positivas confirmadas mediante dos ensayos de inmunoenzimología (ELISA para antígenos totales y proteína recombinante), (II) Muestras que fueron recolectadas entre 2020 y 2024, (III) Muestras que contasen con 200 µL de ADN extraído a partir de sangre periférica.

Extracción de ADN a partir de Muestras de Suero

La extracción de ADN se llevó a cabo utilizando el kit Quick-DNA/RNA Viral MagBead de Zymo Research. Se añadieron 5 µL de proteinasa K, 200 µL de muestra de suero y 200 µL de Shield 2X DNA/RNA a un tubo. La mezcla se agitó a 1300 rpm. Luego, se incorporaron 800 µL de Buffer Viral DNA/RNA, y se agitó nuevamente bajo las mismas condiciones. A continuación, se añadieron 20 µL de perlas magnéticas y se agitó el tubo. Posteriormente, los viales se colocaron en un soporte magnético y se retiró el sobrenadante sin remover las perlas. Se realizaron dos lavados con las soluciones de lavado 1 y 2 del kit, añadiendo 500 µL de cada una, agitando y descartando el sobrenadante. Luego, se realizaron dos lavados adicionales con etanol al 95%. Finalmente, los viales se incubaron en un bloque seco a 60 °C, y se añadió agua libre de

ADNasa/ARNasa para eluir el ADN [20]. La calidad y pureza del ADN extraído a partir de suero fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa y espectrofotometría UV-Vis utilizando el equipo NanoDrop™ 2000 de Thermo Scientific™. Los resultados de pureza cumplieron con los estándares de calidad establecidos por el laboratorio.

Detección del ADN de *T. cruzi* mediante qPCR

Para detectar *T. cruzi*, se utilizaron los primers TCZ1 y TCZ2, que amplifican una secuencia repetitiva del ADN satelital [21]. La qPCR se realizó con el kit SYBR™ Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), empleando 2 µL de ADN resuspendido a 50 ng/µL. Las condiciones de reacción fueron: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 minuto. Se preparó una curva de calibración con diluciones seriadas del cultivo de *T. cruzi* (de 10⁷ a 10⁻³ copias por mililitro) [22], para discriminar eficazmente entre resultados positivos y negativos. El gen GAPDH se amplificó como control de extracción [23].

Análisis Estadístico y Visualización de Datos

El análisis estadístico se realizó utilizando RStudio. Se efectuó una prueba t de Welch para comparar los valores de Ct de las amplificaciones del gen GAPDH y del ADN satelital de *T. cruzi* entre las muestras de sangre periférica y suero. Además, se calculó el índice Kappa de Cohen para evaluar la concordancia entre los resultados de detección de *T. cruzi* en ambas matrices.

RESULTADOS

Se detectó ADN satelital de *T. cruzi* en 9 muestras de suero (30%) y en 7 muestras de sangre periférica (23.33%) mediante qPCR utilizando SYBR Green. El análisis de las curvas de melting reveló un único amplicón, con una temperatura de melting de aproximadamente 81.5 °C (Figura 1). Todos los resultados fueron validados mediante la amplificación del gen GAPDH.

Los resultados de la prueba t de Welch mostraron una diferencia estadísticamente significativa en los valores de Ct para GAPDH entre sangre periférica y suero ($t = -4.6712$, $p < 0.0001$), con una media de Ct significativamente más baja en sangre periférica (14.79) en comparación con suero (23.76) (IC 95%, -12.89 a -5.07). En contraste, el análisis de los valores de Ct para *T. cruzi* no reveló diferencias significativas entre sangre periférica y suero ($t = -1.3548$, $p = 0.2233$), con medias de Ct de 34.29 y 32.70, respectivamente (IC 95%, -20.11 a 5.73). Los resultados indican que el tipo de muestra afecta la amplificación del gen GAPDH, posiblemente por una mayor concentración de ADN en sangre periférica. Sin embargo, para *T.*

cruzi, no se encontró evidencia suficiente de que el tipo de muestra influya en los valores de Ct, sugiriendo una eficiencia similar de amplificación en ambos casos. El índice Kappa de Cohen fue 0.831 (IC 95%, 0.607 a 0.831), indicando una alta concordancia entre los resultados de qPCR en sangre periférica y suero. La Figura 2 muestra una comparación visual de los valores de Ct en ambas matrices, destacando la distribución de los datos.

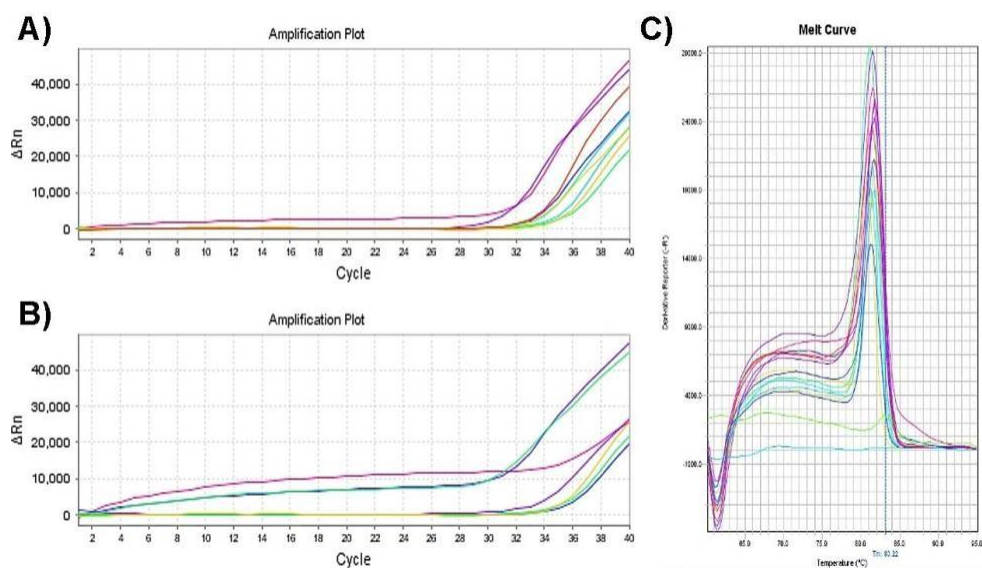


Figura 1. A) Diagrama de curvas de amplificación de muestras de suero positivas mediante qPCR. **B)** Diagrama de curvas de amplificación de muestras de sangre periférica positivas mediante qPCR. **C)** Curva de Melting correspondiente a muestras positivas mediante qPCR.

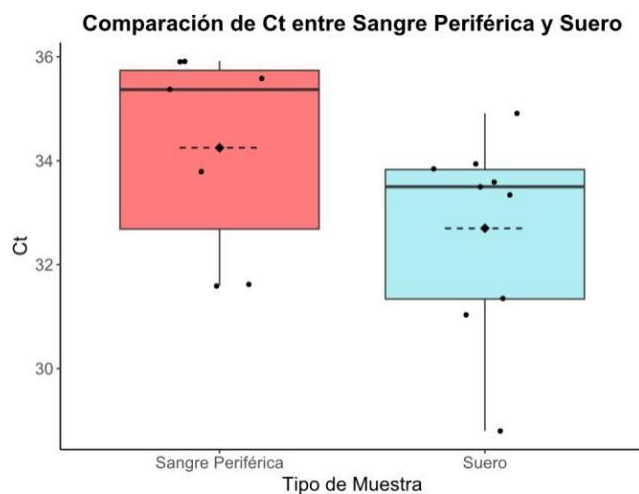


Figura 2. Boxplot comparativo de los Ct obtenidos para *T. cruzi* en sangre periférica y suero.

En la población analizada en este estudio, se observó una distribución equitativa de género, con un 50% de hombres y un 50% de mujeres. Las edades de los participantes variaron entre 30 y 85 años, con una media aproximada de 62 años. En cuanto a antecedentes médicos, 11 pacientes (36,67%) reportaron hipertensión arterial (HTA), 1 paciente (3,33%) presentó insuficiencia cardíaca (IC), 1 (3,33%) cardiopatía y 1 (3,33%) arritmia (ver Tabla 1). La alta prevalencia de HTA sugiere una posible comorbilidad significativa que podría influir en la progresión de la enfermedad o ser una consecuencia de la misma.

Tabla 1. Características de los pacientes de acuerdo a su municipio de residencia.

	Chima		Capitanejo		El Guacamayo		San Vicente		Bucaramanga		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Participantes	10	33,33	9	30,00	5	16,67	4	13,33	2	6,67	30	100,00
Sexo												
Masculino	5	16,67	4	13,33	2	6,67	2	6,67	2	6,67	15	50,00
Femenino	5	16,67	5	16,67	3	10,00	2	6,67	0	0,00	15	50,00
Edad media	65,7	-	57	-	64,4	-	60,75	-	61,35	-	61,84	-
Cardiovasculares												
HTA	5	16,67	1	3,33	2	6,67	3	10,00	0	-	11	36,67
IC	0	-	0	-	0	-	1	3,33	0	-	1	3,33
Cardiopatía	0	-	0	-	0	-	1	3,33	0	-	1	3,33
Arritmia	1	3,33	0	-	0	-	0	-	0	-	1	3,33

En la Tabla 2 se muestran los datos correspondientes a los 13 pacientes con muestras positivas para qPCR. La edad promedio de este grupo fue de aproximadamente 73 años. De estos pacientes, únicamente 4 (30,77%) reportaron hipertensión arterial, lo que impide establecer una relación con detección de ADN.

Tabla 2. Características de pacientes con resultados positivos mediante qPCR de acuerdo a su municipio de residencia.

	Chima		Capitanejo		El Guacamayo		Bucaramanga		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Participantes	2	15,38	7	53,85	2	15,38	2	15,38	13	100,00
Sexo										
Masculino	0	0,00	3	23,08	1	7,69	1	7,69	5	38,46
Femenino	2	15,38	4	30,77	1	7,69	1	7,69	8	61,54
Edad media	74,5	-	59,57	-	80,5	-	61,35	-	68,98	-
HTA	1	7,69	1	7,69	2	15,38	0	-	4	30,77

DISCUSIÓN

El análisis de qPCR reveló una tasa de detección de ADN de *T. cruzi* del 30% (n=9) en muestras extraídas a partir de suero, y de 23,33% (n=7) en las de sangre periférica. Estudios previos han comparado la capacidad de detección de ADN satelital de *T. cruzi* en muestras de sangre periférica y suero mediante PCR. Dos de ellos, lograron detectar ADN del parásito en un porcentaje más alto de muestras de suero frente al presente estudio [14,24]. Lo anterior podría deberse a que en ambos

estudios se utilizó una muestra poblacional mayor y, por tanto, más representativa. En contraste, los resultados obtenidos demostraron un mayor porcentaje de muestras positivas en suero comparado con otro estudio donde fue del 18,1% [25]. Por otro lado, al comparar el valor de la media de Ct para *T. cruzi* en suero con otros reportados en la literatura, se encuentran valores que varían entre 30,3 y 32,48 cercanos a los hallados en este estudio [14,26].

Cabe señalar, que la falta de uso de buffer de clorhidrato de guanidina-EDTA en la preparación de la muestra de sangre periférica representó un factor limitante, pues podría haber comprometido la viabilidad de las muestras, ya que esta sustancia previene la degradación por ADNasas durante el almacenamiento [27]. Por otro lado, los valores altos de Ct en las muestras de suero pueden estar relacionados con la limitada presencia de ADN del parásito circulando en sangre en pacientes en fase crónica. A pesar de estos desafíos, la temperatura de melting (T_m) obtenida se alinea con los valores reportados en la literatura para *T. cruzi* bajo condiciones similares [28,29,30], lo que confirma la especificidad del producto amplificado.

La detección de ADN de *T. cruzi* en muestras de pacientes con ECh en fase crónica sugiere que el parásito puede circular en sangre durante esta etapa, posiblemente durante episodios de parasitemia. En futuros estudios, se podría investigar la detección del parásito mediante métodos directos en sangre durante la fase crónica y correlacionarla con el estado de salud de los pacientes para obtener una comprensión más completa de la dinámica de la infección y su impacto en la progresión de la enfermedad.

CONCLUSIÓN

Se detectó ADN de *T. cruzi* en suero de pacientes en fase crónica, sin diferencias significativas con respecto a sangre periférica, indicando una eficiencia de amplificación similar en ambas matrices. Estos hallazgos confirman la viabilidad del suero para la detección del parásito y apoyan su uso complementario en el diagnóstico y monitoreo de la enfermedad. Además, estos resultados abren oportunidades para futuros estudios sobre la dinámica del parásito en fase crónica.

REFERENTE BIBLIOGRÁFICO

- [1] Enfermedad de Chagas [Internet]. Paho.org. [citado el 3 de agosto de 2024] Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- [2] World Health Organization: WHO. (2024, 4 abril). *Enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana)*. [citado el 3 de agosto de 2024] [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))

- [3] Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clín (Engl Ed)* [Internet]. 2017; [citado el 3 de agosto de 2024] 148(3):125-31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcle.2017.02.007>
- [4] Molina, I., Salvador, F., & Sánchez-Montalvá, A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, [citado el 3 de agosto de 2024] 34(2), 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.12.008>
- [5] Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2012 [citado el 3 de agosto de 2024];54(6):845-52. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22238161/>
- [6] Schijman AG, Alonso-Padilla J, Britto C, Herrera Bernal CP. Retrospect, advances and challenges in Chagas disease diagnosis: a comprehensive review. *Lancet Reg Health Am* [Internet]. 2024; [citado el 7 de agosto de 2024]36(100821):100821. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lana.2024.100821>
- [7] 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* [Internet]. 2016 [citado el 3 de agosto de 2024];10(9):e0004997. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0004997>
- [8] Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med* [Internet]. 2015; [citado el 3 de agosto de 2024] 373(14):1295-306. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa1507574>
- [9] Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS, et al. Follow-up of an asymptomatic Chagas disease population of children after treatment with nifurtimox (Lampit) in a sylvatic endemic transmission area of Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 [citado el 3 de agosto de 2024];9(2):e0003465. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0003465>
- [10] Simón, M., Iborra, M. A., Carrilero, B., & Segovia, M. (2020). What is the role of real time PCR in the follow up of patients with chronic Chagas' disease? *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed)*, [citado el 3 de agosto de 2024] 38(8), 353-355. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.07.003>
- [11] 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 Diagn* [Internet]. 2015; [citado el 3 de agosto de 2024] 17(5):605-15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.010>
- [12] Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MFAD, Lima-Ferreira C, Guhl F, 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* [Internet]. 2013; [citado el 3 de agosto de 2024] 125(1):23-31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.08.020>
- [13] Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LHC, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and

- meta-analysis. BMC Infect Dis [Internet]. 2010 [citado el 7 de agosto de 2024];10(1):337. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-10-337>
- [14] Hernández, C., Teherán, A., Flórez, C., & Ramírez, J. D. (2018). Comparison of parasite loads in serum and blood samples from patients in acute and chronic phases of Chagas disease. *Parasitology*, [citado el 3 de agosto de 2024] 145(14), 1837-1843. <https://doi.org/10.1017/s0031182018000598>
- [15] ¿Qué es Suero? *Diccionario Médico. Clínica U. Navarra*. (s. f.). [citado el 7 de agosto de 2024] <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/suero>
- [16] 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 [Internet]. 2009 [citado el 24 de agosto de 2024];3(4):e419. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000419>
- [17] Avila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol [Internet]. 1991 [citado el 29 de agosto de 2024];48(2):211-21. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1662334/>
- [18] Sulleiro E, Salvador F, Martínez de Salazar P, Silgado A, Serre-Delcor N, Oliveira I, et al. Aportaciones de las técnicas moleculares en la fase crónica de la Enfermedad de Chagas en ausencia de tratamiento. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica [Internet]. [citado el 7 de agosto de 2024] 2020;38(8):356-60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eimc.2020.01.003>
- [19] INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. Informe de evento Enfermedad de Chagas, Colombia, 2022 [Internet]. 2023. [citado el 30 de agosto de 2024] Disponible en: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/INFORME%20CHAGAS%202022.pdf>
- [20] Zymo Research. Quick-DNA/RNATM Viral MagBead [Internet]. 2022. [citado el 24 de agosto de 2024] Disponible en: https://files.zymoresearch.com/protocols/_r2140_r2141_quick-dna-rna_viral_magbead.pdf
- [21] Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of Trypanosoma cruzi by DNA amplification using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol [Internet]. 1989 [citado el 24 de agosto de 2024];27(7):1477-82. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.27.7.1477-1482.1989>
- [22] Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, 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 [Internet]. 2013 [citado el 27 de agosto de 2024];7(1):e2000. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002000>
- [23] Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model: Accurate RT-qPCR in a wound healing model. Wound Repair Regen [Internet]. 2010 [citado el 24 de agosto de 2024];18(5):460-6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-475x.2010.00611.x>

- [24] Arcela Higuera Gélvez A. DIAGNÓSTICO DE *Trypanosoma cruzi* EN MUESTRAS DE SANGRE Y SUERO POR METODOS SEROLOGICOS Y MOLECULARES [Internet]. [citado el 27 de agosto de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/98c0808f-f841-4e39-89b0-67adde12ee67/content>
- [25] Kann S, Concha G, Weinreich F, Hahn A, Rückert C, Kalinowski J, et al. Comparative assessment of two commercial real-time PCR assays for the diagnosis of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *Microorganisms* [Internet]. 2023 [citado el 27 de agosto de 2024];11(4):901. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/11/4/901>
- [26] Melo MF, Moreira OC, Tenório P, Lorena V, Lorena-Rezende I, Júnior WO, et al. Usefulness of real time PCR to quantify parasite load in serum samples from chronic Chagas disease patients. *Parasit Vectors* [Internet]. [citado el 30 de agosto de 2024] 2015;8(1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-015-0770-0>
- [27] Flores-Chávez M, de Fuentes I, Gárate T, Cañavate C. Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2007 [citado el 30 de agosto de 2024];25:29-37. Disponible en: <https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=13111835&r=28>
- [28] Chan-Pérez JI, Torres-Acosta JFJ, Ortega-Pacheco A, Hernández-Cortazar IB, Cigarroa-Toledo N, Jiménez-Coello M. Combined use of real-time PCR and serological techniques for improved surveillance of chronic and acute American trypanosomiasis in dogs and their owners from an endemic rural area of Neotropical Mexico. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis* [Internet]. 2022 [citado el 30 de agosto de 2024];2(100081):100081. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.crpvbd.2022.100081>
- [29] Ferreira Filho JCR, Braz LMA, Andrino MLA, Yamamoto L, Kanunfre KA, Okay TS. Mitochondrial and satellite real time-PCR for detecting *T. cruzi* DTU II strain in blood and organs of experimentally infected mice presenting different levels of parasite load. *Exp Parasitol* [Internet]. [citado el 27 de agosto de 2024] 2019;200:13-5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2019.03.007>
- [30] Ferreira J de JG, Costa SCB, Addas-Carvalho M, Pereira MB, França A de O, de Lima RG, et al. Evaluation of molecular methods to identify Chagas disease and leishmaniasis in blood donation candidates in two Brazilian centers. *Pathogens* [Internet]. [citado el 27 de agosto de 2024] 2023;12(4):508. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/d8b7/27bd33ca9d71eb1b40c3cc67cef69e4d197b.pdf>

CORRESPONDENCIA

Santiago Mendoza Pedraza

Escuela de Microbiología, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander
+57 3504508902

santiago.mendoza.pedraza@gmail.com