



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Transmisión por transfusión de la enfermedad de Chagas. Estudio de la carga parasitaria y viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en los componentes sanguíneos y valoración de métodos de reducción de patógenos mediante herramientas moleculares

María Beatriz Cancino Faure

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

Transmisión por transfusión de la enfermedad de Chagas. Estudio de la carga parasitaria y viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en los componentes sanguíneos y valoración de métodos de reducción de patógenos mediante herramientas moleculares

MARÍA BEATRIZ CANCINO FAURE

2016



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE BIOLOGIA, SANITAT I MEDI AMBIENT

LABORATORI DE PARASITOLOGIA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

Memoria presentada por María Beatriz Cancino Faure para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona, bajo la codirección de la Dra. Roser Fisa Saladrigas y la Dra. María Cristina Riera Lizandra en el Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente.

Dra. Roser Fisa Saladrigas

Dra. María Cristina Riera Lizandra

Barcelona, 2016

Roser Fisa Saladrigas y María Cristina Riera Lizandra, Doctoras en Farmacia y Profesoras Titulares de la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Universitat de Barcelona.

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “Transmisión por transfusión de la enfermedad de Chagas. Estudio de la carga parasitaria y viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en los componentes sanguíneos y valoración de métodos de reducción de patógenos mediante herramientas moleculares”, presentado por la Licenciada en Tecnología Médica, ha sido realizado en la Sección de Parasitología del Departamento de Biología, Sanidad y Medio Ambiente de la Universitat de Barcelona, bajo su dirección y cumple con las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Barcelona, Septiembre de 2016

Dra. Roser Fisa Saladrigas

Dra. María Cristina Riera Lizandra

Directora de la Tesis Doctoral

Directora de la Tesis Doctoral

M. Beatriz Cancino Faure

Doctoranda

AGRADECIMIENTOS

Primero quisiera agradecer a mis directoras de tesis, a la Dra. Cristina Riera por aceptarme como tesista en el equipo de trabajo y por compartir experiencias y conocimientos cuando lo necesité. A la Dra. Roser Fisa por guiar la parte experimental y enseñarme con dedicación a escribir y a publicar artículos. Gracias por su cercanía y amistad, sin duda han sido más que mis directoras de tesis. Espero poder seguir colaborando con ustedes desde el otro lado del mundo.

Pieza fundamental en la elaboración de este trabajo han sido la Dra. Teresa Jiménez y el Dr. Enrique Girona de la *Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears*. Gracias por trabajar codo a codo con nosotras, por entregarnos su experiencia, conocimiento y ayuda con tan buena disposición en todo momento. Gracias también al equipo de trabajo del banco de sangre por recibirme y ayudarme en todo cuanto necesité en mis estadias en Mallorca.

A Francesc Codony y el equipo de trabajo del Laboratori de Microbiologia Sanitària i Mediambiental de la Universitat politècnica de Catalunya por invitarme a su laboratorio y ayudarme con el diseño de los experimentos publicados en uno de los artículos de esta tesis.

A las profesoras y profesores de la Unidad de Parasitología y a mis compañeras y compañeros de laboratorio, Magda, Diana, Carla, Roser, Xevi, Carme, Silvia, Cristina, Ibeth, Míriam, Anna, Alba. Gracias a cada uno por aportar una buena experiencia a mi estadia en el laboratorio y en especial a quienes me entregaron su amistad y ayuda. A Diana con quien compartimos cada día (o casi) la hora de comer y muchas horas de conversaciones sobre la vida fuera del laboratorio. A Magda que a pesar de haber compartido sólo en el último tiempo fue muy agradable tu compañía, gracias por el apoyo y preocupación.

A mi familia por la paciencia que han tenido en tenerme lejos de casa, por estar siempre atentos a lo que necesito y por tratar de entender que esta experiencia ha sido de las más enriquecedoras de mi vida. A mi mamá por su cariño y las largas horas de conversación al teléfono.

A Roberto gracias por entregarme tu cariño, comprensión, paciencia, apoyo incondicional y por formar conmigo una nueva familia junto con este pequeñín que acaba de llegar.

A los amigos que hice estos años viviendo aquí, a Lorena y Taco, Carlos, Luigi, Atif, Coté, Juan Pa y tantos otros con quien compartimos buenos momentos. A los amigos artistas de *El Torn*, Paula, Héctor, Lola, Martin, Thais, Marina y Montse gracias por su buena onda y cariño... y que viva la cerámica gres!!. Héctor gracias por el diseño y maquetación de la portada de esta tesis.

A los amigos de toda la vida por estar siempre ahí, en especial al Juane y Lucía gracias por su cercanía y compañía estos años lejos de casa. Estamos felices de que vuelvan a Chile justo cuando nosotros también volvemos.

A esta maravillosa ciudad que ya ha pasado a ser mi casa y a la cual espero volver a vivir algún día. Los mejores recuerdos y experiencias las llevo en la memoria y en el corazón, adéu Barcelona.

Este trabajo ha sido en parte financiado por CONICYT Becas Chile (72130155), por el Plan Nacional R&D+i 2008–2011 y ISC III -Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación (PI 10/00533) y fue parte del proyecto 2014 SGR 1241 de la Generalitat de Catalunya.

A mi madre

ÍNDICE

PRÓLOGO.....	i
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. AGENTE ETIOLÓGICO Y ENFERMEDAD.....	3
1.1.1. Clasificación taxonómica de <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.1.2. Formas evolutivas y ciclo biológico.....	4
1.1.3. Presentación clínica de la enfermedad.....	5
1.2. VÍAS DE TRANSMISIÓN.....	6
1.2.1. Transmisión vectorial.....	6
1.2.2. Transmisión vertical.....	8
1.2.3. Transmisión por transfusión.....	8
1.2.4. Transmisión oral.....	11
1.2.5. Otras vías de transmisión.....	11
1.3. DIAGNÓSTICO.....	12
1.3.1. Diagnóstico parasitológico convencional.....	12
1.3.2. Diagnóstico serológico.....	13
1.3.3. Diagnóstico molecular y detección de viabilidad.....	14
1.4. BANCO DE SANGRE Y SEGURIDAD TRANSFUSIONAL.....	18
1.4.1. Selección de donantes de sangre.....	18
1.4.2. Obtención de sangre, fraccionamiento y almacenamiento.....	18
1.4.3. Leucorreducción y tecnologías de reducción de patógenos.....	20
1.4.4. Hemovigilancia y <i>look-back</i> de enfermedades infecciosas.....	23
2. OBJETIVOS.....	25
3. RESULTADOS.....	29
3.1. ARTÍCULO 1: Evidence of meaningful levels of <i>Trypanosoma cruzi</i> in platelets concentrate from seropositive blood donors.....	31
3.2. ARTÍCULO 2: Why are platelets the most frequently mentioned blood component in Chagas transfusion transmission reports?.....	43
3.3. ARTÍCULO 3: Where do the <i>Trypanosoma cruzi</i> go? The distribution of parasites in blood components from fractionated infected whole blood.....	49
3.4. ARTÍCULO 4: The effectiveness of riboflavin and UV light pathogen reduction technology in eliminating <i>Trypanosoma cruzi</i> from leukoreduced whole blood.....	59
3.5. ARTÍCULO 5: Detection and quantification of viable and non-viable <i>Trypanosoma cruzi</i> parasites by a propidium monoazide-qPCR assay.....	83
4. DISCUSIÓN.....	95
5. CONCLUSIONES.....	111
6. BIBLIOGRAFÍA.....	115

RESUMEN

La investigación desarrollada en el presente trabajo se ha dirigido a estudiar la presencia y viabilidad de *Trypanosoma cruzi* en diferentes componentes sanguíneos, para profundizar en el conocimiento de la transmisión por transfusión (TT) de la enfermedad de Chagas, así como a diseñar y optimizar una herramienta molecular basada en la detección de DNA (PMA-qPCR), que permita diferenciar parásitos vivos y muertos aplicada a ensayos de viabilidad del parásito de manera simple, precisa y de fácil aplicación sobre distintas matrices.

La presencia del parásito se ha estudiado en sangre y en componentes sanguíneos (plasma y plaquetas obtenidos por aféresis) de donantes seropositivos de la *Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears*, provenientes de zonas endémicas de la enfermedad de Chagas que residen en las islas Baleares. Además, se han llevado a cabo estudios en sangre total experimentalmente infectada y separada mediante fraccionamiento clásico para conocer su distribución en plasma, placa leucoplaquetaria y fundamentalmente en concentrado de hematíes, que ha sido recientemente citado como un componente sanguíneo involucrado en un caso de transmisión por transfusión de *T. cruzi*. Así mismo, se han evaluado los actuales métodos de leucorreducción y tecnologías de reducción de patógenos utilizados en los bancos de sangre, para valorar su efectividad en disminuir tanto la carga parasitaria como la viabilidad del parásito en estudios experimentales. Para llevar a cabo estos estudios se han utilizado herramientas moleculares sensibles y específicas que han permitido detectar y cuantificar tanto DNA como RNA del parásito, mediante tecnología qPCR con sondas TaqMan y con SYBR Green.

La búsqueda de posibles donantes seropositivos con parásitos detectables en sangre, para ser incluidos en el estudio, ha permitido obtener datos sobre la seroprevalencia de la enfermedad de Chagas en los donantes, siendo ésta de 1,9%. Además ha permitido detectar que el 60,9% presentaban parasitemia, con cargas menores a 1 parásito equivalente por mL. El estudio para determinar la presencia del parásito en los componentes sanguíneos obtenidos mediante plaqueto/plasmáféresis, ha mostrado que la mayor carga parasitaria se localiza en las plaquetas ($5,33 \pm 6,12$ parásitos equivalentes/mL) y no en el plasma, con un valor promedio cinco veces mayor que en sangre periférica ($0,42 \pm 0,32$ parásitos equivalentes/mL), lo que confirma el riesgo de

RESUMEN

TT asociado a este componente sanguíneo ya documentado en los diferentes casos publicados de transmisión.

En el estudio experimental de sangre total infectada y separada mediante fraccionamiento clásico, los componentes sanguíneos con mayor concentración de parásitos detectados han sido la placa leucoplaquetaria y el concentrado de hematíes sin leucorreducir. La elevada carga parasitaria encontrada en el concentrado de hematíes sin leucorreducir evidencia el riesgo asociado a TT por este componente sanguíneo, que decrece significativamente cuando es sometido a leucorreducción mediante filtración, observándose una reducción de 99,9%. Por otro lado, los estudios realizados en sangre total infectada experimentalmente para evaluar la efectividad de un filtro leucorreductor, han mostrado la presencia de un remanente de parásitos viables, que no han sido detectados después de haber sido sometidos a la tecnología de reducción de patógenos basada en riboflavina y luz ultravioleta. Ello indica el interés de utilizar ambos métodos de modo conjunto para eliminar el riesgo de TT.

La importancia de conocer la viabilidad de las formas parasitarias y simplificar las metodologías de estudio, llevó a diseñar y a optimizar la técnica *cruzi* PMA-qPCR que utiliza el colorante propidio monoazida (100 μ M PMA), capaz de unirse covalentemente al DNA e impedir su posterior amplificación, pero incapaz de atravesar membranas íntegras de células vivas. El método ha permitido una reducción promedio de la señal de qPCR de 2,5 unidades de logaritmos₁₀ y un porcentaje de reducción de 98% entre en las concentraciones de parásitos viables y no viables ensayados ($10^{-1} \times 10^5$ parásitos/mL). Esta técnica permite diferenciar entre epimastigotes de *T. cruzi* vivos y muertos, por lo que puede ser utilizada como un método de viabilidad y cuantificación mediante detección de DNA, aplicable tanto en diagnóstico como investigación.

ABREVIATURAS

AABB	<i>American Association of Blood Banks</i>
AMCHA	Iniciativa para los Países del Amazonas
Bst polimerasa	<i>Bacillus stearothermophilus</i> polimerasa
CAD	<i>Compound adsorption device</i>
cDNA	DNA complementario
CE	Conformidad europea
Cq	Ciclo de cuantificación
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DTU	<i>Discrete typing units</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMA	Etidio monoazida
FBSTIB	<i>Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HAI	Hemoaglutinación indirecta
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
INCOSUR	Iniciativa del Cono Sur
IPA	Iniciativa para los Países Andinos
ITS	<i>Intergenic ribosomal spacer</i>
kDNA	DNA del kinetoplasto
LAMP	<i>Loop-mediated isothermal amplification</i>
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
LRU	Leucorreducción universal
mL	Mililitro
μL	Micro litro

ABREVIATURAS

μM	Micromolar
nDNA	DNA nuclear
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PAHO/TDR	<i>Panamerican Health Organization/Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases</i>
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PMA	Propidio monoazida
PMA-qPCR	Propidio monoazida qPCR
qPCR	PCR en tiempo real
RAPD	<i>Random amplification polymorphic DNA</i>
rRNA	RNA ribosomal
RT-qPCR	<i>Reverse transcription qPCR</i>
Taq polimerasa	<i>Thermus aquaticus</i> polimerasa
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TESA-blot	<i>Trypomastigote excreted-secreted antigen-blot</i>
TRP	Tecnologías de reducción de patógenos
TT	Transmisión por transfusión
UVA	Luz ultravioleta A
UVB	Luz ultravioleta B
vECJ	Nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WB	<i>Western Blot</i>
XD	Xenodiagnóstico

PRÓLOGO

Estado actual de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas es una infección parasitaria básicamente de tipo crónica, producida por *Trypanosoma cruzi*, un protozoo parásito flagelado. La enfermedad ha estado presente desde hace millones de años de forma enzoótica en las Américas, transmitida principalmente por insectos vectores del género *Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*, afectando a más de 100 especies de mamíferos entre ellos al ser humano (1). Además de la vía clásica de transmisión, la exposición a sangre contaminada de la madre al hijo en el embarazo o mediante transfusión sanguínea son las principales formas de infección; el trasplante de órganos y los accidentes de laboratorio constituyen un grupo de menor riesgo (2, 3).

Esta enfermedad afecta alrededor de 6-7 millones de personas a nivel mundial, con una incidencia anual de 28.000 casos en las Américas (4). De los infectados entre un 30 a un 40% desarrollan cardiomiopatía y un 10% síndromes digestivos o ambos. Reconocida por la OMS como una de las 17 infecciones tropicales desatendidas en el mundo y aunque continúa siendo un problema social y económico en muchos países de América Latina, la enfermedad de Chagas ha sido objeto de varias estrategias de intervención en las últimas tres décadas. Las diferentes iniciativas implementadas para el control de la enfermedad por los países endémicos han centrado el foco de atención en las dos vías principales de transmisión: el control de vectores y los programas de cribado universal de la sangre en los bancos de sangre, lo que ha contribuido a reducir la incidencia y prevalencia de la enfermedad (2, 5).

Producto de la globalización y de los movimientos migratorios se le considera una enfermedad emergente y un problema de salud pública en países no endémicos. Con la ausencia de vectores naturales, las principales amenazas provienen de transfusiones de componentes sanguíneos infectados y de la transmisión vertical de madre a hijo. Se estima que existen actualmente más de 300.000 individuos infectados con *T. cruzi* en EEUU, más de 80.000 en Europa, siendo Italia y España los países con mayor número de afectados (6,7). Estos movimientos poblacionales han planteado nuevos desafíos epidemiológicos, sociales y políticos para los gobiernos de estos países (8), poniendo de manifiesto la necesidad de mejorar los sistemas de información y vigilancia a nivel nacional y

supranacional en países no endémicos, implementar la atención médica para los pacientes con enfermedad de Chagas, controlar la transmisión vertical, implementar controles adicionales para bancos de sangre y trasplante de órganos, mejorar las herramientas diagnósticas e incluir el diagnóstico diferencial de Chagas dentro de los protocolos de salud.

Problemática de la transmisión por transfusión de la enfermedad de Chagas

El estudio de la transmisión por transfusión (TT) de la enfermedad de Chagas es un área de fundamental interés tanto en zonas endémicas como no endémicas, por ser una de las principales rutas de transmisión en especial en aquellos países que no poseen políticas públicas de control de la enfermedad. Actualmente, se dispone de escasos trabajos que hayan investigado la TT de esta infección. Sin embargo, lo que sí ha quedado claramente documentado es que las plaquetas son el componente sanguíneo que con mayor frecuencia ha sido involucrado en los casos de transmisión de *T. cruzi* por transfusión (9). La transfusión de sangre total no se ha asociado claramente a transmisión de la enfermedad (9). Recientemente, un caso de TT de concentrado de hematíes ha sido publicado sin que los autores hayan mencionado si el componente implicado fue o no leucorreducido (9). Todo ello, plantea la necesidad de estudios que investiguen la transmisión de *T. cruzi* por transfusión para contribuir al conocimiento y prevención de la transmisión de la enfermedad por esta vía. En el presente estudio, fruto de la colaboración entre la *Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears* (FBSTIB) y la Universitat de Barcelona, se han estudiado muestras obtenidas de donantes latinoamericanos procedentes de zonas endémicas, entre los años 2011 al 2015 y muestras de componentes sanguíneos infectados artificialmente con el parásito. La FBSTIB es el centro regional de transfusión que gestiona la extracción, el procesamiento, el análisis y la distribución de las donaciones de sangre y tejidos del archipiélago balear (Ibiza-Formentera, Mallorca y Menorca). La FBSTIB realiza un promedio de 41.095 donaciones al año procedentes de 24.696 donantes, de los cuales un 88,7% son españoles y un 11,3% son extranjeros, correspondiendo el 0,7% de estos donantes a personas procedentes de Latinoamérica (10), lo que nos ha permitido llevar a cabo el presente estudio.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. AGENTE ETIOLÓGICO Y ENFERMEDAD

1.1.1 Clasificación taxonómica

Trypanosoma cruzi es un parásito protozoo flagelado, que según la revisión actualizada (11,12) se clasifica de la siguiente manera:

Reino Protista Goldfuss 1818; Owen 1858
 Phylum Euglenozoa Cavalier-Smith, 1981
 Clase Kinetoplastea Cavalier-Smith, 1981
 Familia Trypanosomatidae Doflein, 1901
 Género *Trypanosoma* Gruby, 1843
 Subgénero *Schyzotrypanum* Chagas, 1909
Trypanosoma (S.) cruzi Chagas, 1909

La clasificación de las cepas de *T. cruzi* ha ido variando en el tiempo y continúa haciéndolo a medida que herramientas moleculares más específicas son desarrolladas. Numerosos enfoques, así como un amplio rango de marcadores moleculares han sido estudiados para caracterizar las poblaciones de *T. cruzi*, con el objetivo de definir un número de subgrupos pertinentes. Éstos han recibido distintas denominaciones como zimodemas (13,14), esquizodemas (15), biodemas (16), clonets (17), linajes (18), ribocladados (19), haplotipos (20,21) y más recientemente, unidades discretas de tipificación (DTU, del inglés “discrete typing units”) (22).

En una primera reunión realizada en 1999, un comité de expertos llegó al acuerdo de dividir en dos grandes grupos las cepas de *T. cruzi* según el conocimiento disponible en ese momento (23), *T. cruzi* I y *T. cruzi* II, que fueron agrupadas según sus características biológicas y bioquímicas (como biodemas y zimodemas) y según técnicas moleculares (amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD) del gen del mini-exón DNA ribosomal 24S α) (18,24,25). Debido a la clara diversidad genética de las poblaciones de este parásito y gracias al desarrollo de nuevos marcadores moleculares, se propuso posteriormente dividir *T. cruzi* en 6 linajes, donde se mantuvo el Tc I original y el linaje Tc II se subdividió en 5, Tc IIa - Tc IIe (26,27). En el año 2009, se definió mediante consenso, la clasificación actual de seis diferentes DTUs (26,28,29) TcI a TcVI, y una séptima en discusión (Tcbat), las que se refieren a un conjunto de poblaciones genéticamente más cercanas entre sí que con otra población, estables en el tiempo y que se pueden identificar por marcadores moleculares, genéticos

o inmunológicos comunes (22). Constituyen unidades confiables para el análisis de la epidemiología molecular y de los estudios experimentales de la evolución del taxón cruzi. El DTU más abundante y ampliamente distribuido es TcI que se encuentra en un amplio rango de triatomos y se asocia tanto al ciclo selvático como doméstico. La infección en seres humanos por este tipo de DTU se presenta principalmente en América Central y está asociado con el desarrollo de cardiomiopatías. En la región del cono sur, tanto TcII como TcV y TcVI están asociados con ser la principal causa de la enfermedad de Chagas. TcII predomina en la zona este y central de Brasil, TcV en Argentina, Bolivia y Paraguay, y TcVI en el Gran Chaco. TcIII está principalmente asociado con el ciclo selvático en Brasil y países vecinos, y los casos documentados de infección en humanos son excepcionales (29). Hasta hoy no existe ningún método de tipificación de consenso, sino más bien algoritmos o esquemas de tipificación, ya que un único objetivo genético no permite una completa resolución de las DTUs (29).

1.1.2. Formas evolutivas y ciclo biológico

Los trypanosomátidos presentan ciclos de vida complejos con diferentes estadios de desarrollo que se alternan entre hospederos vertebrados e invertebrados. El ciclo de vida de *T. cruzi* (Figura 1) presenta varias formas evolutivas en los hospederos mamíferos y en los triatomos vectores: tripomastigote, amastigote y epimastigote. La forma tripomastigota presente en la sangre de los mamíferos se describe con forma de “C” pequeña (16-20 μm) con un gran kinetoplasto cerca del extremo posterior, un flagelo libre y una membrana ondulante. La forma amastigota (1,5-4,0 μm) se presenta dentro de las células del hospedero mamífero, en la cual el parásito se divide por fisión binaria. Los epimastigotes corresponden a la forma de reproducción dentro del vector y en medios de cultivos axénicos y además de poseer un mayor tamaño (35-40 μm) que los tripomastigotes, el kinetoplasto se encuentra situado anterior al núcleo.

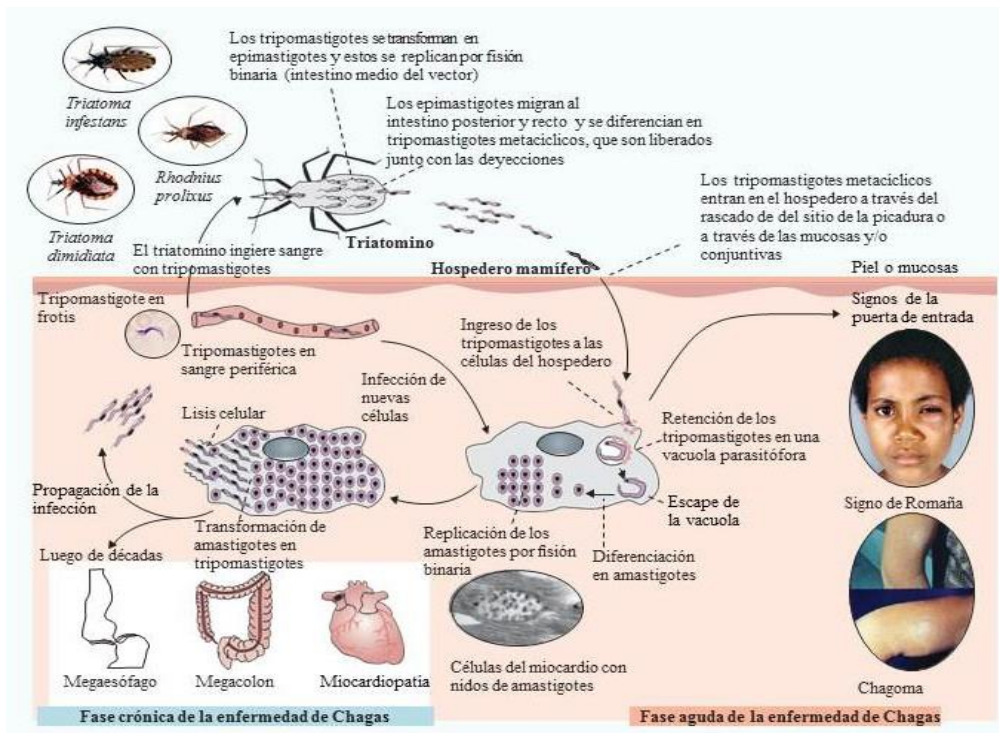


Figura 1. Ciclo biológico de *T. cruzi* (Adaptado de Rassi A. *et al* 2010) (1)

T. cruzi es transmitido vía heces de sus insectos vectores. El parásito ingresa al hospedero por microabrasiones en la piel o directamente a través de las mucosas (conjuntiva o gástrica), mediante las formas metacíclicas de tripomastigotes de *T. cruzi* que se desarrollan en intestino posterior del vector y que son capaces de invadir muchos tipos de células distintas incluyendo macrófagos, células del músculo estriado o liso y fibroblastos. Posterior a la invasión celular los tripomastigotes quedan retenidos en una vacuola parasitófora de la cual más tarde escapan, se diferencian en amastigotes y se dividen libres en el citoplasma. Posteriormente al proceso de división binaria, los amastigotes se vuelven a diferenciar al estado flagelado de tripomastigotes, los cuales son liberados al romperse la célula del hospedero. El ciclo se completa cuando un vector pica a un hospedero infectado alimentándose de la sangre y adquiriendo las formas tripomastigotas de *T. cruzi* (30,31).

1.1.3. Presentación clínica de la enfermedad

La enfermedad de Chagas inicialmente cursa con una fase aguda que dura de dos a cuatro meses después de contraer la infección ya sea por la vía clásica anteriormente mencionada, por vía vertical, oral, transfusional o trasplante de órganos. Durante esta fase aguda circulan por el torrente sanguíneo una gran cantidad de parásitos. En la mayoría de los casos no hay síntomas o éstos son leves y el sistema inmune logra controlar la infección y reducir la parasitemia. En menos del 50% de las personas aparece un signo inicial característico que es una lesión cutánea o hinchazón amoratada de un párpado (signo de Romaña-Mazza). Además puede haber fiebre, dolor de cabeza, aumento de tamaño de ganglios linfáticos, palidez, dolores musculares, dificultad

INTRODUCCIÓN

para respirar, hinchazón y dolor abdominal o torácico. Una vez que han desaparecido los síntomas y la enfermedad permanece silente comienza la fase crónica, los parásitos permanecen ocultos principalmente en el músculo cardiaco y digestivo, con una baja parasitemia. Esta etapa puede durar toda la vida del enfermo. Hasta un 30% de los pacientes sufren trastornos cardiacos y hasta un 10% presentan alteraciones digestivas (típicamente agrandamiento del esófago o del colon), neurológicas o mixtas. Cuando los pacientes presentan este tipo de alteraciones se le denomina enfermedad de Chagas crónica con manifestaciones de enfermedad. Con el paso de los años, la infección puede causar muerte súbita o insuficiencia cardiaca por la destrucción progresiva del músculo cardiaco. Cuando la enfermedad se presenta silente durante toda la vida del enfermo se le denomina enfermedad de Chagas crónica sin manifestaciones de enfermedad, término que viene a reemplazar al de fase indeterminada (32,33).

1.2. VIAS DE TRANSMISIÓN

1.2.1. Transmisión vectorial

Sólo presente en áreas endémicas de la infección, se produce cuando parásitos presentes en las deyecciones del insecto penetran por la herida que causa la picadura, por lesiones en la piel, activamente a través de la piel o por las mucosas de ojos, boca o nariz. Los triatomíneos capaces de transmitir la enfermedad son del orden Hemiptera, Familia Reduviidae, Subfamilia Triatominae. Más de 140 especies son considerados potenciales transmisores de la infección (34,35), siendo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* los vectores con mayor importancia en la transmisión del parásito al ser humano (36). Su hábitat natural incluye palmeras, huecos en los árboles, grietas en las piedras, pequeñas cuevas y otros refugios de animales donde pueden encontrar alimento. Han sido documentados más de 100 especies de pequeños mamíferos infectados por *T. cruzi*, que pueden actuar como reservorios naturales de la infección (37). Este ciclo de transmisión enzoótico entre vectores y reservorios existe hace millones de años y es conocido como el ciclo silvestre de la enfermedad. Sin embargo, con la llegada del hombre a América (38) algunas especies de triatomíneos, como *T. infestans*, lograron adaptarse, colonizar y prosperar en los domicilios y peridomicilios humanos en su mayoría rurales, donde transmiten el parásito al humano y animales domésticos como perros y gatos (39). Este ciclo de transmisión es conocido

como el ciclo doméstico. Ambos ciclos no ocurren necesariamente aislados uno de otro, sino que según las características eco-epidemiológicas de cada lugar se pueden superponer con distinta frecuencia, pudiendo ocurrir la invasión de vectores silvestres a los domicilios, sobre todo cuando el vector doméstico ha sido eliminado (40).

Cuatro iniciativas de vigilancia y control de la infección se han llevado a cabo en Latino América por los Ministerios de Salud de los países del Sur y de América Central, con la intermediación de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) / Organización Mundial de la Salud (OMS): la Iniciativa del Cono Sur (INCOSUR), la Iniciativa de los Países Andinos (IPA), la iniciativa para los países de América Central y México y la Iniciativa para los Países del Amazonas (AMCHA) (41–43). Uno de los principales objetivos de estas iniciativas es el de disminuir la transmisión vectorial, realizando numerosos planes de desinfestación domiciliaria aplicando insecticidas (44), iniciativas que han logrado en el Cono Sur, la interrupción de la transmisión vectorial de *T. cruzi* por *T. infestans* y eliminación del vector en Uruguay (1997-2012); la interrupción de la transmisión vectorial por *T. infestans* en Chile (1999), Brasil (2006), Paraguay (Región Oriental, 2008; Alto Paraguay, 2013), Argentina (8 provincias entre 2001 y 2013) y Bolivia (Departamento de La Paz y Departamento de Potosí, 2011 a 2013). En Centroamérica, la interrupción de la transmisión vectorial por *R. prolixus* en Guatemala (2008), El Salvador (2010), Honduras (2010), Nicaragua (2010), Costa Rica (2010) y Belice (2010); así como la caracterización de la transmisión extradomiciliaria desde el ciclo silvestre en Panamá (2013). En la región Andina, la interrupción de la transmisión vectorial por *T. infestans* en Perú (Departamentos de Tacna y Moquegua); además de 10 Municipios de los Departamentos de Casanare, Boyacá, Santander y Arauca en Colombia (2013). En México se ha certificado la eliminación de *R. prolixus* en Chiapas y Oaxaca (45). Durante la fase de vigilancia después de la desinfestación, se ha observado que otras especies de triatominos silvestres o peridomésticos han surgido como supuestos vectores secundarios de *T. cruzi* (46). Sin embargo, se sabe que sólo son buenos vectores aquellos en los que el tiempo entre la alimentación y la deyección es el más corto y por lo tanto, no todos los vectores infectados con el parásito serán exitosos en traspararlo (47). Los éxitos alcanzados en la interrupción de la vía vectorial le ha dado una mayor importancia relativa a otras formas de transmisión como la vertical, por transfusiones y por trasplante de órganos en los países endémicos.

Mención especial requiere Estados Unidos, que no puede ser clasificado como un área

estricta no endémica como Europa o Asia, debido a que en el sur de ese país existe transmisión enzoótica, con al menos 11 tipos de triatomíneos involucrados en la transmisión y varios hospederos. Sin embargo, el número de casos autóctonos publicados que han adquirido la infección por vía vectorial desde el año 1955 son sólo 23 (6,48,49), muy probablemente este reducido número de casos se deba a las mejores condiciones de vivienda y a la menor eficiencia de los vectores presentes. En realidad, la gran mayoría de individuos infectados en este país corresponde a inmigrantes procedentes de áreas endémicas de Latino América.

1.2.2. Transmisión vertical

T. cruzi puede ser transmitido desde la madre infectada al hijo durante cualquier etapa del embarazo y en una o en todas las gestaciones (50). Se estima que la incidencia es mayor a 15.000 casos anuales en áreas endémicas, según datos de la OMS (5), siendo las tasas de transmisión variables entre regiones geográficas, 10% en Paraguay (51,52), 3,4–8,6% en Bolivia (53,54), 2,3%–4,7% en Chile (55,56), 1,4%–1,7% en Brasil (57,58), 7–11% en Argentina (59,60) y 4,1–12,0% México (61). Poco se sabe sobre los mecanismos de esta transmisión, pero se cree que estarían implicados la respuesta inmune de la madre, características de la placenta y el tipo de cepa del parásito (62). Con un diagnóstico y tratamiento tempranos del infante (dentro del primer año de vida) la eliminación del parásito es cercana al 100% (63). La migración de mujeres latino americanas durante las últimas décadas a zonas no endémicas ha hecho que el riesgo de transmisión vertical se haya extendido a países como Estados Unidos, Canadá, Australia, Japón y Europa (64–66). Casos de Chagas congénito han sido documentados en EEUU (67), España (68,69) y Suiza (70), lo que ha llevado a que en algunos países como España existan programas de control de la enfermedad en mujeres inmigrantes embarazadas, siendo Cataluña y Valencia pioneros en el cribado de embarazadas y control del recién nacido (71,72).

1.2.3. Transmisión por transfusión

La transmisión de la enfermedad de Chagas por transfusión fue propuesta en el año 1945 por Dias, pero no fue hasta el año 1952 en que se documentaron los primeros casos en Brasil (73,74). Debido a que pueden pasar años sin que los pacientes crónicamente infectados presenten síntomas de la enfermedad y por lo tanto, desconocen que están enfermos, existe un riesgo considerable de transmisión del

parásito a través de la transfusión de sangre. Esto viene apoyado por el hecho que más del 50% de los individuos infectados crónicamente presentan parásitos detectables en sangre periférica (75,76). El riesgo de adquirir la enfermedad de Chagas tras recibir una transfusión procedente de un donante infectado está entre 10-25% (1,77,78), porcentaje que aumentaría en aquellos pacientes politransfundidos (76). La probabilidad de transmisión dependería de factores como la concentración de parásitos inoculados, el estado inmunológico del receptor y el tipo de componente sanguíneo transfundido. Se ha visto que tanto la sangre total como las plaquetas están con mayor frecuencia implicadas en la transmisión, pero son las plaquetas las que poseen el mayor riesgo (79,80). Un caso de transmisión ha sido recientemente publicado debido a la transfusión de un concentrado de hematíes (9).

Las diferentes iniciativas puestas en marcha por los gobiernos de los países de áreas endémicas para el control de la enfermedad, se han centrado en las dos vías principales de transmisión de la infección: el control de los vectores y los programas de escrutinio universal de donantes de sangre, lo que ha permitido hasta la fecha la implementación, en casi el 100%, de programas de cribado universal. Sin embargo, aún existen países como México en que si bien poseen una baja prevalencia de la enfermedad (81), el escrutinio serológico no está completamente logrado (61,82). Actualmente, los principales objetivos de estos países son mantener la cobertura alcanzada del 100% de escrutinio de donantes de sangre, perfeccionar el control de calidad de reactivos y pruebas de cribado en los bancos de sangre, desarrollar indicadores que permitan evidenciar/confirmar la interrupción de la transmisión por vía transfusional y promocionar la donación de sangre procedente de donantes voluntarios (83). El riesgo residual de la TT de *T. cruzi* en países endémicos que llevan a cabo el cribado universal en las donaciones de sangre está alrededor de 1:200.000 unidades (84,85).

Fruto de la globalización y la migración de personas desde países latino americanos a países no endémicos, la enfermedad de Chagas se ha convertido en un problema de salud pública a nivel mundial, convirtiendo la transfusión en una de las principales formas de adquisición de la enfermedad de Chagas (3,8). Existen casos publicados de TT de la enfermedad de Chagas en EEUU (86,87), Canadá (88) y España (89). En países como EEUU (90), Canadá (91), Japón (92) y Australia (93) se han implementado medidas para controlar el riesgo de TT; como el cribado selectivo o la exclusión definitiva/temporal de donantes de sangre susceptibles de tener la infección,

INTRODUCCIÓN

ya sea por provenir de un área endémica, ser hijo de madre proveniente de área endémica o haber vivido o viajado durante algún tiempo a países endémicos. Aunque hay países en los cuales no se ha implementado ninguna medida como puede ser China (93).

La mayoría de los países pertenecientes a la Unión Europea siguen la directiva de la Unión Europea 2004/23/CE y 2006/17/CE (94) sobre seguridad y calidad de la sangre, donde se especifica como criterio de exclusión permanente para donar sangre el antecedente de la enfermedad de Chagas. En la entrevista médica previa a la donación de sangre se pregunta sobre el antecedente de enfermedad de Chagas y sólo se excluye como donante si la respuesta es afirmativa. Muchos individuos en riesgo de infección nunca se han realizado una prueba de cribado y contestarán negativamente, siendo de este modo donantes potencialmente en riesgo de transmitir la infección. Actualmente, sólo España (95), Francia (96) y el Reino Unido (97) disponen de una normativa legal que especifica el escrutinio de *T. cruzi* obligatorio previo a la donación en todos aquellos donantes provenientes de áreas endémicas, hijos de madres procedentes de área endémicas o personas que hayan recibido transfusiones en áreas endémicas. Sin embargo, países como Italia, Portugal, Suecia y Suiza, que junto con los tres países anteriormente citados son los que poseen mayor inmigración procedente de Latinoamérica, están en proceso de cambiar sus actuales políticas para mejorar la detección de posibles donantes que sean portadores de la enfermedad (93,98,99) (Figura 2).

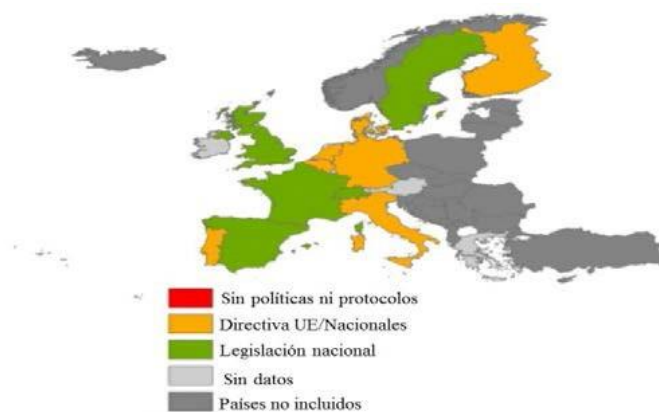


Figura 2. Políticas públicas sobre la transmisión por transfusión de *T. cruzi* en países europeos. (En Requena-Mendez *et al.* 2014) (99)

1.2.4. Transmisión oral

El número de casos y de brotes por esta vía ha ido en aumento en los últimos años, reportándose hasta la fecha más de 1.500 casos, especialmente en la región del Amazonas, en Brasil principalmente pero también en Venezuela, Colombia, Bolivia, Ecuador y Argentina (100). Aparece como una importante vía de transmisión en áreas endémicas, aún más en aquellas en que se ha certificado la interrupción vectorial y donde se mantiene el ciclo silvestre de la infección. Se ha visto además que presenta altas tasas de mortalidad (101).

La transmisión oral está asociada al consumo de comida como carne de animales salvajes, zumos o jugos de fruta caseros o artesanales, contaminados con el parásito o con el vector infectado con el parásito (102). Actualmente, se clasifica como infección de tipo alimentaria en áreas endémicas (103,104). Un punto interesante sobre esta transmisión es que cualquier especie de triatomino puede ser considerado un buen transmisor del parásito si se considera que sólo deberá estar infectado con las formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* para transmitir el parásito (47). De hecho *Panstrongylus geniculatus*, considerado un mal vector para la transmisión cutánea por su reflejo tardío de deyección, se ha convertido en el principal triatomino asociado a brotes orales por su fácil adaptación a la vivienda e incursión en cocinas y habitaciones (105).

Las iniciativas de vigilancia y control de la infección, que se llevan a cabo en Latino América, están logrando la vigilancia y prevención en red de los brotes orales de Chagas en la región Amazónica de Brasil, Ecuador, Colombia, Guyana, Guyana Francesa y Perú (45).

1.2.5. Otras vías de transmisión

Existen otras vías de transmisión de la enfermedad, menos comunes que las anteriores, como son el trasplante de órganos y los accidentes de laboratorio. En el caso de la vía mediante trasplante de órganos, la importancia radica en que la inmunosupresión del receptor puede generar una fase aguda grave de la enfermedad muchas veces dando como resultado la muerte; existen casos publicados tanto en áreas endémicas como no endémicas (106). Las infecciones por medio de punciones o por contacto directo con formas tripomastigotas con mucosa en accidentes de laboratorio, son de alto riesgo

debido a la inoculación directa de la forma infectante (107), pero que afortunadamente las buenas prácticas de laboratorio y las normas de bioseguridad ayudan a mitigar su incidencia (108); pocos casos han sido documentados por esta vía (109,110).

1.3. DIAGNÓSTICO

Actualmente los métodos diagnósticos para la enfermedad de Chagas se consideran insatisfactorios (5), no existiendo un método “*gold standard*” que se utilice como referencia. De rutina en los laboratorios, se utilizan métodos serológicos, parasitológicos y/o métodos moleculares dependiendo de la fase de la infección. El diagnóstico es complejo debido a que el parásito posee estadios intra y extracelulares durante la infección del hospedero. La fase aguda de la infección y los casos congénitos presentan tasas elevadas de parásitos circulantes en el torrente sanguíneo, por lo que la infección es detectable mediante la búsqueda del parásito o su material genético en sangre periférica, hasta cuatro semanas post infección (1). En cambio, en la fase crónica de la infección, los parásitos en sangre pueden ser indetectables por métodos parasitológicos clásicos, por lo que se recomienda la detección de anticuerpos mediante serología excepto cuando existe inmunosupresión en el paciente, en los que el uso de métodos moleculares son de ayuda por la gran sensibilidad que presentan (111).

1.3.1. Diagnóstico parasitológico convencional

Para el diagnóstico directo de la infección se pueden utilizar técnicas como la observación microscópica de la sangre fresca con anticoagulante o de la capa leucoplaquetaria en busca de formas móviles del parásito (59,112). Así como la examinación de frotis teñidos con colorante de Giemsa donde se puede reconocer la morfología característica del parásito (113). Una técnica validada y ampliamente utilizada para el diagnóstico directo es el microhematocrito, con una sensibilidad reportada en la fase aguda de la infección de hasta 97,4% (114). La desventaja de estas técnicas es que son altamente dependientes del operador, del tiempo de observación, del número de muestras y de la motilidad del parásito (115).

El hemocultivo, técnica que ha sido ampliamente utilizada para la búsqueda y aislamiento de *T. cruzi*, es una prueba de referencia para el diagnóstico, ya que permite confirmar la presencia del parásito viable y aislarlo, pero tiene como desventaja que no conduce a un diagnóstico rápido, lo que hace de esta técnica inadecuada para las

decisiones terapéuticas inmediatas, además que no puede ser utilizada en recién nacidos por el gran volumen de sangre requerido (10-30 mL). El hemocultivo para *T. cruzi*, que utiliza medios de cultivo especializados como Liver Infusion Tryptose (LIT) descrito por Chiari y colaboradores, 1989 (116) y modificado por Luz y colaboradores, 1999 (117), ha permitido a algunos investigadores obtener valores de sensibilidad de 94% en pacientes crónicos al estudiar tres muestras seriadas (118). Otros autores no han podido reproducir tales valores con iguales condiciones de la técnica (119), reportándose sensibilidades entre 36,5 % y 70% (116,120–122). Otra técnica utilizada es el xenodiagnóstico (XD), creada en 1914 (123) y modificada a través del tiempo para normalizar su uso y mejorar su sensibilidad, reportándose valores de 9% hasta un 87,5% tanto en pacientes crónicos como en agudos (42,124–127). La técnica utiliza triatomos no infectados que se alimentan de sangre del paciente, realizándose posteriormente observaciones del contenido intestinal del vector en busca del parásito.

1.3.2. Diagnóstico serológico

Posterior a la fase aguda, la producción de anticuerpos contra diferentes antígenos de *T. cruzi* (de superficie, somáticos, de excreción-secreción o metabólicos) permite realizar el diagnóstico serológico, valorándose fundamentalmente los anticuerpos que pertenecen a la clase IgG, subclases IgG1 e IgG3. Los métodos de detección convencionales más ampliamente utilizados para el inmunodiagnóstico son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (128), la hemoaglutinación indirecta (HAI) (129) y las técnicas de enzimoimmunoensayo (ELISA) (130). La OMS sugiere la utilización de dos técnicas diagnósticas que utilicen antígenos o principios diferentes, debido a la distinta capacidad inmunogénica de cada cepa, a la distinta respuesta inmune de tipo humoral que desarrolla cada paciente y a las reacciones cruzadas que pueden obtenerse, especialmente con otros tripanosomátidos, cuando se utilizan antígenos crudos del parásito (131). Cuando ambas técnicas son discordantes entre sí o se encuentran en el límite de detección, una tercera técnica debe ser realizada. Una alternativa eficaz es el western blot (WB), que aunque no utilizada de rutina por su laboriosidad, facilita confirmar la infección además de permitir detectar reactividad cruzada con *Leishmania* spp. (132–134). Puede ser realizada en base a antígeno crudo (135) o a antígeno metabólico TESA-blot (*Trypomastigote excreted-secreted antigen*) (136), el cual actualmente está disponible en forma comercial sólo en Latino América.

Tanto la IFI, HAI como ELISA están actualmente disponibles en forma comercial. Algunos de los ELISAs comerciales producidos con antígenos crudos son Ortho® *T. cruzi* ELISA, Test de ELISA para Chagas III®, Test ELISA cruzi®, Chagatek ELISA®, entre otros. Algunos de los ELISAs comerciales producidos con fracciones semipurificadas o antígenos recombinantes de *T. cruzi* son BIOELISA Chagas Biokit®, Chagatest ELISA, Pathozyme ® Chagas. En general el uso de ELISA con antígenos recombinantes posee mayor especificidad que aquellos producidos con antígenos crudos totales del parásito. La sensibilidad y especificidad reportada de estos ensayos va entre 94%–99,5% y 94%–96% respectivamente según datos de la OMS (5). En un estudio de revisión realizado por Brasil y colaboradores (137) encontraron valores estimados de sensibilidad y especificidad para ELISAs comerciales de 97,7% (96,7%–98,5%) y 97,5% (88,5%–99,5%) respectivamente.

Recientemente, se utilizan técnicas totalmente automatizadas para su uso de rutina en hospitales y bancos de sangre que permiten procesar un mayor número de muestras con una mayor estandarización y reproducibilidad de los resultados, así como una interpretación objetiva de los mismos. El inmunoensayo quimioluminiscente de micropartículas, actualmente fabricado por dos marcas distintas, CMIA ARCHITECT® Chagas Assay y CLIA LIAISON® XL murex Chagas. ARCHITECT® utiliza 4 antígenos recombinantes y/o péptidos sintéticos de tres fases distintas del ciclo biológico de *T. cruzi* (138) que según autores como Iborra-Bendicho y colaboradores (139), tendrían valores de sensibilidad de 100% y de 96,6% de especificidad. Praast y colaboradores (2011), lo señalan como un potencial único ensayo en el diagnóstico de la enfermedad por su precisión y sensibilidad (138). LIAISON ® utiliza una mezcla de antígenos recombinantes pero no existen estudios publicados hasta la fecha.

1.3.3. Diagnóstico molecular y detección de viabilidad

Mediante técnicas de reacción de polimerasa en cadena (PCR) se detecta el DNA del parásito en la muestra mediante su amplificación millones de veces, por lo que son más sensibles que los métodos de microscopía o hemocultivo (140); por ello últimamente se ha incrementado su uso en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes con enfermedad de Chagas. Se ha demostrado su utilidad en el diagnóstico en pacientes agudos y congénitos (141), pero en pacientes en la fase crónica su utilidad es limitada debido a las bajas cargas parasitarias que éstos presentan, reportándose valores de

sensibilidad de la técnica muy variables que oscilan entre 1,2% (142) a 93,3% (143) y que dependerán del volumen de sangre recolectado, del procesamiento de la muestra, de los cebadores de la PCR y del protocolo y reactivos utilizados (144). Además se ha evidenciado como una buena herramienta para el seguimiento de pacientes trasplantados con órganos provenientes de donantes seropositivos para la enfermedad. En estos pacientes la cuantificación de la carga parasitaria post trasplante mediante PCR mejora el tiempo de detección de los receptores que hayan podido infectarse, comparado con las técnicas de diagnóstico directo, que requieren de mayores cargas parasitarias para poder observar o aislar el parásito en sangre, o con técnicas serológicas donde la producción de anticuerpos ocurre tardíamente y de forma irregular al ser pacientes inmunocomprometidos (145,146). Las técnicas moleculares tienen además utilidad como marcadores de respuesta terapéutica posterior a tratamiento farmacológico. La obtención de resultados persistentes de PCR detectables en sangre puede interpretarse como marcador indirecto de fracaso terapéutico, ya que indica la presencia de parásitos circulantes o trazas de DNA de parásitos destruidos recientemente (144,147).

La elección de la secuencia a amplificar es de suma importancia para poder desarrollar un ensayo con alta especificidad y sensibilidad. Las secuencias específicas más utilizadas como blanco de amplificación para el diagnóstico molecular de *T. cruzi* corresponden tanto a las regiones conservadas como variables del minicírculo presentes en gran número en el DNA del kinetoplasto (kDNA) (148–151), así como a la secuencia satélite (DNA-SL) de 195 pb que se encuentra en el DNA nuclear, que es conservada y altamente repetitiva, organizada en series, con unas 10^4 - 10^5 copias por genoma (152,153). Otras secuencias blanco que se han utilizado son el gen RNA ribosomal 24 α S (154) y la región intergénica ribosomal (Intergenic Ribosomal Spacer, ITS) (155). La combinación de PCRs que amplifican diferentes secuencias, mediante algoritmos, también se ha utilizado para determinar las DTUs de las cepas aisladas o directamente para genotipar los parásitos en muestras clínicas de pacientes, en animales domésticos o del vector (156–159).

El uso de la PCR para el diagnóstico tiene desventajas como el hecho de que no existe un método de referencia estandarizado y que cada técnica puesta a punto posee distinto rendimiento para el diagnóstico, eso sumado a la alta variabilidad genética presente en las cepas de *T. cruzi* (134,137). Algunos autores recomiendan durante el desarrollo,

INTRODUCCIÓN

estandarización y validación de una técnica de PCR realizar experimentos de inclusividad en que se verifique que el método sea aplicable a poblaciones de *T. cruzi* donde estén representadas las 6 DTUs, debido a que la gran diversidad genética de las cepas pueden originar que un mismo método presente distintos valores de sensibilidad en distintos escenarios clínicos y epidemiológicos (144).

Una variante muy utilizada es la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR), que a diferencia de la PCR convencional permite al mismo tiempo detectar y cuantificar el producto amplificado. Entre las ventajas que posee en relación a la PCR convencional, se pueden mencionar el tiempo de reacción que es menor, ya que no requiere de una posterior corrida electroforética para el análisis de resultados, lo que además evita la contaminación cruzada con amplicones. Permite detectar la carga parasitaria de forma muy sensible con límites de detección publicados de 0,01 a 2 parásitos equivalentes/mL de sangre o de suero (160–164). Entre las desventajas que presenta la qPCR están el ser una técnica cara que requiere el uso de equipos sofisticados y personal entrenado.

Debido a que no existe una única técnica utilizada de referencia para la detección de DNA de *T. cruzi* es que recientemente se han llevado a cabo estudios internacionales para la optimización y validación de la qPCR para muestras clínicas tanto de pacientes chagásicos agudos como crónicos por un conjunto de expertos de diferentes países como iniciativa de un programa de la PAHO/TDR (163,164).

Nuevas metodologías de amplificación como el LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) se están desarrollando para aplicar al diagnóstico. El método utiliza de 4 a 6 partidores y se realiza bajo condiciones de temperatura isotérmicas (60- 65°C); utiliza una enzima denominada Bst DNA polimerasa que posee un alto grado de desplazamiento de las hebras de DNA y a diferencia de la Taq polimerasa casi no se inhibe con las impurezas presentes en la reacción de PCR. Además, al ser una reacción bajo condiciones isotérmicas, se utiliza un termobloque o un baño maría en vez de un termociclador, acortando los tiempos de reacción a una hora (165). Existe una técnica de LAMP desarrollada para la detección de *T. cruzi* que se basa en la amplificación de un fragmento del gen 18s rRNA, que utiliza dos pares de partidores específicos para *T. cruzi*, lo que asegura una alta especificidad de la técnica con una sensibilidad de 0,01 parásitos detectados (166). Sin embargo, aún debe estudiarse su real utilidad clínica.

Los estudios de viabilidad clásicamente han usado métodos de cultivo *in vitro*

específicos para *T. cruzi*, así como también el xenodiagnóstico (XD) que detectan el crecimiento del parásito y confirman la viabilidad además de permitir el aislamiento de las cepas. Sin embargo, ambas metodologías cuentan con baja sensibilidad y presentan largos tiempos de espera que pueden llegar hasta 90 días (150). Las técnicas de biología molecular basadas en la detección de DNA son mucho más sensibles pero tienen la desventaja de que no son capaces de distinguir entre señales de DNA provenientes de parásitos viables o no viables, por lo que un resultado positivo no siempre implica la viabilidad del agente patógeno. Los métodos para evaluar viabilidad, basados en la detección de RNA son los habitualmente utilizados en investigación. Tienen el inconveniente de que son difíciles de usar por la complejidad en el manejo del RNA en muestras biológicas, por el hecho de ser moléculas muy lábiles con una vida media corta, además de ser técnicas caras que requieren equipos especiales y personal entrenado. A través de una PCR con transcripción inversa (RT-PCR) se produce una hebra complementaria de DNA copia (cDNA) del RNA extraído de la muestra, que seguida de la amplificación del cDNA mediante PCR para una secuencia blanco, permite la detección de modo rápido y específico al utilizar cebadores y sondas específicas (167). Souto y colaboradores (154), describieron una RT-PCR para *T. cruzi* basada en la detección de una secuencia del gen RNA ribosomal 24 α S de 100 pb con unas 60.000 copias por genoma.

Recientemente se han desarrollado técnicas que combinan el uso de colorantes vitales con afinidad por los ácidos nucleicos con PCRs convencionales o con qPCRs. Estas técnicas consiguen la amplificación selectiva basándose en la integridad de la membrana plasmática de las células a detectar/cuantificar. Etidio monoazida (EMA) y propidio monoazida (PMA) son dos colorantes membrana impermeables, capaces de unirse covalentemente al material genético mediante la exposición a la luz visible, pero incapaces de atravesar membranas íntegras de células vivas. Sólo en células muertas en las que la membrana está dañada, el colorante es capaz de traspasar la membrana (168,169). Esta unión covalente previene la posterior amplificación del DNA mediante PCR indicando, por lo tanto, la no viabilidad de las células estudiadas. Se ha visto que la eficiencia de estas técnicas depende de una variedad de factores, incluyendo el tipo y la concentración del colorante, la fuente lumínica, las condiciones de incubación y el microorganismo a estudiar, factores que deben ser tomados en cuenta en el momento de realizar la optimización de la técnica (170).

1.4. BANCO DE SANGRE Y SEGURIDAD TRANSFUSIONAL

Uno de los objetivos principales de un banco de sangre es el suministro de sangre segura y de calidad. La obtención de sangre segura se basa entre otras cosas en tres pilares: la apropiada selección de donantes de sangre, los análisis de detección y confirmación de aquellos patógenos transmisibles por transfusión y la aplicación de métodos de reducción de patógenos. Lo anterior, sumado a sistemas de hemovigilancia, es crucial para mantener un sistema de riesgo mínimo de transmisiones de enfermedades infecciosas conocidas o emergentes a través de la transfusión.

1.4.1. Selección de donantes de sangre

La *International Society of Blood Transfusion* (ISBT) y la OMS recomiendan que los donantes de sangre sean voluntarios y no remunerados. De hecho, se ha visto en diferentes estudios que el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas se ve aumentado si la sangre procede de donantes que reciben una remuneración o realizan donaciones por reposición directa, en comparación con la sangre procedente de donantes habituales voluntarios (171–173). Para reducir la probabilidad de transmisión de enfermedades infecciosas por transfusión, además de la donación voluntaria y altruista no remunerada, se debe realizar una adecuada selección del donante a través de la entrevista médica pre- donación, donde se valoran los factores de riesgo más importantes asociados al contagio y transmisión de enfermedades infecciosas (174). En Europa y EEUU el 100% de donación es voluntaria, algo que no ocurre en los países de Latino América, donde menos del 25% de las unidades recolectadas proviene de donantes voluntarios no remunerados (82). Debido al incentivo económico o a la presión que significa tener que donar, existe la posibilidad de que se omitan u oculten datos para evitar ser excluidos de la donación, temporal o definitivamente, aumentando con ello el riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas (85).

1.4.2. Obtención de sangre, fraccionamiento y almacenamiento

Los métodos de obtención de componentes sanguíneos han evolucionado a lo largo de las últimas décadas. Inicialmente, la sangre total se transfundía sin fraccionar, pero partir de los años 1960s se comenzó a fraccionar manualmente para que su uso fuese más eficiente, separando los distintos componentes por centrifugación: hematíes, plaquetas, plasma y crioprecipitado. Actualmente existen equipamientos que permiten

el fraccionamiento automatizado de la sangre mejorando la producción y estandarización de los componentes sanguíneos en comparación con la separación manual, cumpliendo los requisitos de calidad de forma fácil, rápida y reproducible (175,176).

En los años 1970s se inició el desarrollo de la donación de componentes sanguíneos por aféresis como una técnica automatizada de obtención de sangre y separación selectiva de componentes sanguíneos. Para esto el paciente/donante es conectado, a través de un equipo estéril, cerrado y de uso único, a un separador celular automático o máquina de aféresis, que separará el/los componente/s sanguíneo/s seleccionado/s previamente. La mayoría de las máquinas de aféresis utilizan el método de elutriación para leucorreducir el componente sanguíneo recolectado. La elutriación, consiste en un método de separación de componentes sanguíneos que se realiza en una cámara especial que a la vez que va centrifugando, pasa un flujo constante de líquido (plasma en este caso) por la cámara en dirección contraria a la centrifugación, lo que permite que las distintas poblaciones celulares se agrupen según su tamaño y peso específico (177). A la vez que obtiene el componente sanguíneo seleccionado, el separador celular va reduciendo por elutriación la cantidad de leucocitos en el mismo. Dependiendo del tipo de componente extraído se le denomina plasmáfesis, plaquetoféresis, plaquetoplasmáfesis, leucoaféresis, eritroaféresis, etc. Además se puede llevar a cabo en un solo procedimiento la extracción de dos componentes sanguíneos, como en la plaquetoplasmáfesis o en la extracción de plaquetas y hematíes con o sin plasma. En el caso de la obtención de plaquetas, la plaquetoféresis permite la recolección de una o más dosis terapéuticas de un solo donante, además de la leucorreducción del componente sanguíneo. En cambio al partir de sangre total, el concentrado de plaquetas proviene de la centrifugación de 3-5 placas leucoplaquetarias (o *buffy coats* en inglés) de donantes con el mismo grupo sanguíneo ABO y Rh (178) o de la preparación de plasma rico en plaquetas (179). Los concentrados de plaquetas se almacenan a temperatura ambiente, entre 20-24°C y su tiempo máximo de almacenamiento es de 5 días, el cual puede prolongarse a 7 días si se emplea alguna técnica de detección o de reducción de contaminación bacteriana (95).

Para que sea infectivo, el parásito deberá permanecer viable durante el procesamiento y posterior almacenamiento de los componentes sanguíneos. Se ha documentado que *T. cruzi* puede sobrevivir a 4°C durante 18 días, que sería resistente a la criopreservación y

a la congelación–descongelación en sangre infectada (73,84,180,181), asimismo puede perdurar hasta 257 días en sangre total con citrato, almacenada a temperatura ambiente (182). Martin y colaboradores (183), estudiaron diferentes formas de almacenamiento de *T. cruzi* en sangre periférica artificialmente infectada, en cultivo celular y en cultivo *in vitro*. Las formas de almacenamiento estudiadas fueron: temperatura ambiente, refrigeración, criopreservación a -80°C con y sin crioprotección. Estos autores encontraron que, en sangre periférica experimentalmente infectada con *T. cruzi*, a las 24 horas a T° ambiente, se mantenía el número de parásitos móviles tanto en sangre heparinizada como en sangre coagulada. En condiciones de refrigeración ($0-4^{\circ}\text{C}$) el cultivo celular infectado con *T. cruzi* se mantuvo con parásitos infectantes hasta el día 14 de almacenamiento. En condiciones de almacenamiento a -80°C se encontraron parásitos viables hasta un año post-almacenamiento, con o sin crioprotector, encontrándose una cantidad significativamente mayor de parásitos viables en aquellos que sí estaban congelados con crioprotector. Todo esto demuestra que existe un riesgo real de transmisión del parásito aun siendo este almacenado a temperaturas extremas.

1.4.3. Leucorreducción y tecnologías de reducción de patógenos

En las últimas décadas, nuevas tecnologías han sido desarrolladas con el propósito de reducir el riesgo asociado a la TT de patógenos, así como el de las reacciones adversas asociadas a la transfusión. Todo esto intentando preservar al máximo la calidad y viabilidad de los componentes sanguíneos. Uno de estos métodos es la leucorreducción o retirada de los leucocitos basada en el tamaño, la densidad o la adherencia de estas células. La leucorreducción puede ser realizada mediante centrifugación, separando la placa leucoplaquetaria, mediante el uso de filtros leucorreductores o a través del principio de elutriación empleado por algunos separadores celulares automáticos en las donaciones de aféresis.

La leucorreducción, ideada con el objetivo de reducir el número de leucocitos alogénicos presentes en componentes sanguíneos a transfundir, ha demostrado poseer capacidad para reducir el riesgo de TT de ciertos agentes patógenos (184–187). Es sabido que dependiendo del tipo de leucorreducción se consigue diferente reducción en el número de leucocitos que van desde 1 hasta 3 logaritmos. Se ha visto que mediante centrifugación y posterior separación de la placa leucoplaquetaria sólo se consigue una reducción de 1 logaritmo mientras que el uso de filtros de leucocitos (de tercera y

cuarta generación) y de procedimientos de aféresis, que emplean la elutriación, se logra una reducción de 3 logaritmos, lo que equivale a una reducción del 99,9% de los leucocitos (188). Valor que cumple con las recomendaciones de la Asociación Americana de Bancos de Sangre (189), que especifica una cantidad hasta un máximo de 5×10^6 leucocitos por unidad, y con las de la Unión Europea (190) que permiten hasta un máximo de 1×10^6 leucocitos por unidad. La leucorreducción puede llevarse a cabo pre-almacenamiento o bien post-almacenamiento en el servicio de medicina transfusional del hospital o en el momento de realizar la transfusión al paciente. La leucorreducción pre-almacenamiento tiene como ventaja eliminar los leucocitos antes que ocurra apoptosis y se liberen ciertos tipos de citoquinas (191). Dentro de los beneficios clínicos asociados a la leucorreducción se incluyen la prevención de: las reacciones febriles no hemolíticas, la aloinmunización frente a antígenos leucocitarios humanos (HLAs) y la transmisión de agentes patógenos como citomegalovirus y el virus Epstein-Bar (192,193). Se ha visto además que es efectiva en la reducción de contaminación bacteriana (194) y de hemoflagelados como *Leishmania*, al eliminar los leucocitos que contienen estos parásitos, así como por adherencia directa de las formas extracelulares del parásito en las fibras de los filtros (195,196). Aunque *T. cruzi* no está presente en su forma intracelular en sangre periférica del hospedero, se ha visto que los filtros leucorreductores son eficaces en reducir la carga parasitaria en sangre infectada, mediante la adherencia directa de los parásitos a las fibras del filtro (197).

La leucorreducción universal (LRU) está definida como el proceso mediante el cual se reduce el contenido de leucocitos en sangre total, el concentrado de hematíes y de plaquetas en todas las transfusiones a cualquier tipo de paciente, independiente de su situación clínica. El Reino Unido junto con Canadá y algunos países de la Unión Europea, implementaron la LRU como medida preventiva frente a la posible TT de la nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en 1998. Actualmente el uso de LRU es controvertido y no existe consenso a nivel mundial en cuanto a su realización de forma universal (198,199). Un informe realizado por la Agencia Sanitaria de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía concluye que no existe suficiente evidencia científica que justifique la realización de la LRU, ni ventajas añadidas a la reducción de leucocitos por otros métodos como la eliminación de la capa leucocitaria y/o la leucorreducción selectiva (200). Así mismo, la Asociación Brasileira de Hematología, Hemoterapia y Terapia Celular, recientemente ha decidido que no

INTRODUCCIÓN

existe suficiente justificación para su uso en todos los componentes sanguíneos (201). Hay determinadas situaciones clínicas en las que es necesario extremar las medidas de seguridad transfusional para evitar los efectos adversos relacionados con la presencia de leucocitos alogénicos y sobre las que existe consenso de los especialistas en Medicina Transfusional (enfermos inmunocomprometidos, prematuros, pacientes politransfundidos, etc.) en los cuales sí estaría recomendada la leucorreducción selectiva de los componentes sanguíneos (202–204).

Las nuevas tecnologías de reducción de patógenos (TRP) suponen un cambio de paradigma para la seguridad transfusional, pasando de una estrategia reactiva a una proactiva para prevenir la transmisión de enfermedades infecciosas. Un gran número de infecciones, sobre todo emergentes, pueden ser transmitidas por transfusión. En la actualidad, las TRP complementan los procedimientos destinados a limitar la presencia de patógenos y los efectos adversos asociados a la transfusión sanguínea (205). Dos de los sistemas comercialmente disponibles se utilizan en rutina en algunos países europeos, tanto para plasma como para las plaquetas; el basado en la adición al componente de riboflavina y luz ultravioleta (UV) y el basado en la adición de amotosaleno y luz UV. En ambos sistemas, la molécula fotosensible se intercala en el DNA y/o en el RNA tras la iluminación con luz UV, dañando irreversiblemente el ácido nucleico de los microorganismos o células nucleadas e impidiendo su posterior replicación, lo que significa que además de actuar sobre patógenos también actúa sobre los leucocitos.

La riboflavina (vitamina B2) es un compuesto químico, hidrosoluble, que tiene la propiedad de unirse fotoquímicamente a las bases nitrogenadas posterior a su iluminación con luz ultravioleta B (UVB) (265-370 nm), oxidando las bases de guaninas, dañando la cadena de ácido nucleico que no puede ser reparado por ningún mecanismo endógeno de la célula, imposibilitando la posterior replicación. La principal ventaja de este compuesto y los metabolitos producidos por la acción fotoquímica (lumicromo, 2'ceto-riboflavina, 4'ceto-riboflavina y formilmetilflavina) es que no requieren ser retirados del componente sanguíneo antes de transfundirlo, al ser metabolitos que ya se encuentran normalmente presentes en la sangre, aunque en bajas concentraciones (205,206).

El amotosaleno o S-59 es un compuesto fotoquímico sintético que posterior a la iluminación con luz ultravioleta A (UVA) (320-400 nm) reacciona con las bases pirimídicas del material genético y forma enlaces covalentes, lo que resulta en uniones intra o inter-catenarias que impiden la replicación de la célula. Posterior al procedimiento, se debe retirar el amotosaleno restante que haya quedado libre y todos los metabolitos producidos mediante un dispositivo de adsorción de compuestos (CAD).

1.4.4. Hemovigilancia y *look-back* de enfermedades infecciosas

En el concepto de hemovigilancia se incluyen todos aquellos procesos destinados a detectar rápidamente la propagación de enfermedades transmisibles por transfusión sanguínea y fomentar la mejora de la seguridad transfusional. Dentro de los sistemas de hemovigilancia se incluyen los estudios retrospectivos (*look-back*, en inglés) que consisten en investigar a los receptores de unidades de sangre de donantes que hayan seroconvertido en donaciones subsecuentes, o volver a analizar la sangre de un donante cuando el receptor de su sangre ha experimentado una enfermedad infecciosa post transfusión. Además, es esencial mantener una comunicación fluida con las redes nacionales e internacionales de alerta y vigilancia de enfermedades infecciosas, que permita actualizar de forma rápida y eficaz los conocimientos vigentes sobre los posibles brotes de enfermedades infecciosas que puedan afectar al abastecimiento de sangre (174,207).

En el caso de Chagas es importante llevar a cabo procedimientos de hemovigilancia activa en los receptores de sangre debido a que las infecciones agudas son detectadas en general en pacientes inmunodeprimidos. Es posible, que en pacientes inmunocompetentes se produzcan casos de transmisión de *T. cruzi*, que no son detectados debido a la levedad, o incluso a la naturaleza asintomática de alguna de las formas de la enfermedad. En pacientes inmunodeprimidos, por el contrario, la infección puede ser grave y llegar incluso a provocar la muerte del paciente.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El *objetivo* de este trabajo ha sido evaluar mediante técnicas moleculares, qPCR y RT-qPCR, la presencia y viabilidad de *T. cruzi* en sangre total y otros componentes sanguíneos, y valorar el papel que las técnicas de leucorreducción por elutriación/filtración y la tecnología de reducción de patógenos pueden tener en disminuir el riesgo de TT de este parásito. Junto a ello, diseñar y optimizar una metodología para evaluar viabilidad del parásito basada en la detección de DNA por qPCR.

Objetivos específicos

- Detectar la infección por *T. cruzi* en donantes de la FBSTIB procedentes de zona endémica mediante cribado serológico y detección de DNA en sangre.
- Determinar la carga parasitaria en sangre total, en el concentrado de plaquetas y en el plasma, obtenidos por plaqueto/plasmaféresis de donantes de sangre con parasitemia.
- Determinar la carga parasitaria en el concentrado de hematíes obtenido por fraccionamiento clásico de sangre total infectada artificialmente.
- Evaluar la efectividad de la leucorreducción por filtración, centrifugación y elutriación en la reducción de la carga parasitaria en los componentes sanguíneos.
- Evaluar la efectividad del sistema riboflavina-luz ultravioleta como método de reducción de formas viables de *T. cruzi*, a través de la cuantificación de DNA y RNA, en sangre total infectada artificialmente.
- Diseñar y optimizar una metodología PMA-qPCR para *T. cruzi* que permita mediante la detección de DNA diferenciar entre parásitos viables y no viables

3. RESULTADOS

3.1. ARTÍCULO 1

“Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelets concentrate from seropositive blood donors”

EVIDENCIA DE NIVELES SIGNIFICATIVOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* EN EL
CONCENTRADO DE PLAQUETAS DE DONANTES DE SANGRE
SEROPOSITIVOS

**Beatriz Cancino-Faure, Roser Fisa, Cristina Riera, Ibeth Bula, Enrique Girona-
Llobera, Teresa Jimenez-Marco**

Transfusion

2015, 55:1249–1255

doi:10.1111/trf.129897

Factor de impacto: 3,225

RESUMEN

De acuerdo a los casos publicados de transmisión por transfusión de *Trypanosoma cruzi*, el riesgo de transmisión de este parásito parece ser mayor con el concentrado de plaquetas que con otro componente sanguíneo. El objetivo de este estudio fue investigar mediante una reacción de polimerasa en cadena en tiempo real de tipo cuantitativa (qPCR), la carga parasitaria detectada en plasma y concentrado de plaquetas leucorreducidos, obtenidos mediante aféresis, de donantes de sangre seropositivos para *T. cruzi* y compararla con la carga parasitaria presente en sangre periférica. Durante los años 2011 al 2013 se llevó a cabo un estudio prospectivo en un grupo de donantes de sangre originarios de zonas endémicas que estuviesen residiendo en las Islas Baleares, España. El plasma y el concentrado de plaquetas leucorreducidos fueron obtenidos mediante aféresis de donantes seropositivos con parasitemias detectables en sangre periférica. Se encontró una seropositividad de 1,9% en 23 de 1.201 donantes estudiados, la carga parasitaria en sangre periférica encontrada en 14 de los 23 donantes (60,86%) fue menor a 1 parásito equivalente/mL. El estudio de los componentes obtenidos por aféresis mostró una media en la carga parasitaria de $5,33 \pm 6,12$ parásitos equivalentes/mL en los concentrados de plaquetas, mientras que no hubo detección de DNA parasitario en ningún plasma. La gran carga parasitaria encontrada en el concentrado de plaquetas, comparado con el plasma y la sangre periférica, podría explicar el mayor riesgo de transmisión de la enfermedad de Chagas asociado a este componente, como ha sido citado en los casos de infección de *T. cruzi* transmitida por transfusión de plaquetas.

Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors

Beatriz Cancino-Faure,¹ Roser Fisa,¹ Cristina Riera,¹ Ibeth Bula,¹ Enrique Girona-Llobera,^{2,3}
and Teresa Jimenez-Marco^{2,3}

BACKGROUND: According to the reported cases of transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection, the risk of *T. cruzi* transfusion transmission appears to be higher with platelet (PLT) products than with other blood components. The aim of this study was to investigate by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) the parasitic load detected in leukoreduced plasma and PLT concentrates collected by apheresis from seropositive *T. cruzi* blood donors and compare them with peripheral whole blood (WB).

STUDY DESIGN AND METHODS: During 2011 to 2013, a prospective study was carried out in a group of blood donors originating from Chagas-endemic areas but who are now living on the island of Majorca, Spain. Leukoreduced plasma and PLT concentrates were collected by apheresis from seropositive blood donors with detectable parasitemias in peripheral WB.

RESULTS: Seropositivity was found in 23 of 1201 donors studied (1.9%), and *T. cruzi* DNA with less than 1 parasite equivalent/mL was detected in peripheral WB in 60.86% (14 of 23) of these. The study in blood components obtained by apheresis from these donors showed that *T. cruzi* DNA with a mean \pm SD parasitic load of 5.33 ± 6.12 parasite equivalents/mL was detected in 100% of the PLT concentrate samples. Parasite DNA was undetectable in the extract taken from plasma collected from donors with a positive qPCR in peripheral WB.

CONCLUSION: The higher parasitic load found in PLT concentrates compared to plasma and peripheral WB would explain the higher transfusion transmission risk of Chagas disease associated with PLT transfusions described in the reported cases of transfusion-acquired *T. cruzi* infection.

As a result of globalization and immigration, emerging blood-borne pathogens such as *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease, are gaining importance in nonendemic countries.¹⁻³ The 20 cases associated with transfusion transmission of *T. cruzi* reported in North America and Spain between 1987 and 2011 were all related to platelet (PLT) concentrates or whole blood (WB), some of which had even been leukoreduced and irradiated.⁴ In these cases, transfusion transmission was confirmed using hemoculture, polymerase chain reaction (PCR), or serology to study the presence of parasites in blood from transfused patients. The retrospective study of the blood component or WB donors involved in these donations was in all cases carried out by serology and, additionally in some cases, using PCR to search for parasite DNA. No

ABBREVIATIONS: BIBB = Balearic Islands Blood Bank; Cq = quantification cycle; GEB = guanidine-EDTA-whole blood; qPCR = quantitative real-time polymerase chain reaction; WB = whole blood.

From the ¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona; the ²Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Mallorca, Balearic Islands; and the ³Institut Universitari d' Investigació en Ciències de la Salut (IUNICS), Universitat de les Illes Balears, Mallorca, Balearic Islands, Spain

Address reprint requests to: Dr Roser Fisa, Av. Joan XXIII s.n. E-08028, Barcelona, Spain; e-mail: rfisa@ub.edu.

This work is part of a research study supported by the National R&D+i Plan 2008-2011 and ISC III -Subdirecció General de Evaluació y Fomento de la Investigación (PI 10/00533), was in part funded by CONICYT/Becas Chile, and is part of the Generalitat de Catalunya 2014 SGR 1241 program.

Received for publication September 22, 2014; revision received November 24, 2014; and accepted November 24, 2014.

doi:10.1111/trf.12989

© 2015 AABB

TRANSFUSION 2015;55;1249-1255

parasite cultures or PCR DNA amplifications were performed in the units that had already been transfused.⁵⁻⁸

As *T. cruzi* is present in the human bloodstream as a trypomastigote, the extracellular form of *T. cruzi*, experimental assays have suggested that as *T. cruzi* adheres to leukoreduction filter fibers, such filters could be used as a means of reducing this organism in infected blood.^{9,10} However, the efficacy of leukoreduction to remove parasites from red blood cell (RBC) units has not been studied and it is not known whether this method completely eliminates the risk of transfusion transmission.

Even though all blood components are potentially infectious, there is no empiric evidence in the literature that RBCs or plasma units are implicated in the transfusion transmission of *T. cruzi*. Most of the reported cases have been associated with PLT transfusion.^{5-8,11}

Over the past few decades, innovative devices, new technologies, and new techniques have been developed in an attempt to decrease the risk of pathogen transfusion transmission, as well as to reduce adverse reactions to transfusion, without altering the quality of blood components. One of these techniques is the leukoreduction of blood products using centrifugation, elutriation, or filtration, based on size, density, or stickiness of the white blood cells (WBCs). The generally accepted clinical benefits include prevention of febrile reactions, alloimmunization to HLAs, and transmission of infectious agents, as well as pathogens associated with WBCs, such as cytomegalovirus or Epstein-Bar virus.¹²

During 2011 through 2013, a prospective study was carried out in blood donors who, although living on the Island of Majorca, originated from Chagas-endemic areas. *T. cruzi* serologic screening was performed to identify positive donors and determine the seropositivity in our geographical area and to enable their inclusion in a qualitative and quantitative parasite study. The parasitic load in PLTs and plasma concentrated obtained by apheresis was studied by quantitative real-time PCR (qPCR) and compared with the parasitemia in peripheral WB.

The aim of this study was to investigate the parasite loads present in WB and other blood components, such as plasma and PLTs, from seropositive *T. cruzi* blood donors and determine whether or not there are any differences in parasitemia levels that could explain which component presents the greatest risk of transmitting pathogens through transfusion.

MATERIALS AND METHODS

Blood donors

During 2011 through 2013, a total of 1201 blood donors who originated from Chagas-endemic areas, but are now living in the Balearic Islands, were tested for *T. cruzi*-specific antibodies in the Balearic Islands Blood Bank (BIBB).

All donors with positive serology who had not been previously treated for the parasite, and consented to be included in the study, were analyzed for parasite load in peripheral WB and blood components, plasma, and PLTs obtained by apheresis. All of them were permanently rejected as donors for patient transfusions.

Ethics statement

This study was approved by the ethical committees of the participating institutions, the Balearic Island Ethic Committee and the Research Ethics Committee of the University of Barcelona. Written informed consent was obtained from all donors for the screening and apheresis study.

In accordance with the Spanish and European regulations, our standard operating procedure for donors who were seropositive for *T. cruzi* by the screening test at the blood bank involved permanent deferral for these individuals. Additionally, donors were immediately referred to the Infectious Disease Unit at the University Hospital in Majorca for follow-up and treatment. Treatment was never delayed by participation in this study.

Screening study

Five milliliters of serum was obtained for serologic study and 10 mL of peripheral WB was collected and immediately mixed with an equal volume of 6 mol/L guanidine hydrochloride-0.2 mol/L EDTA buffer (Sigma, St Louis MO) for molecular study. The mixture guanidine-EDTA-WB (GEB) was stored at 4°C until the DNA purification. GEB samples were not boiled.¹³

Apheresis study

Cell separators and procedures

Fenwal Amicus Version 3.11. Fenwal Amicus (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany) is an apheresis device capable of dual- and single-needle plateletpheresis. The PLT-rich plasma is separated from the RBCs and WBCs in a bell-shaped chamber with two compartments. After the elutriation process, PLT-rich plasma is pumped to the collection chamber as so-called dry PLTs, that is, high-concentration plasma-reduced PLTs. At the end of the process, the PLTs are manually resuspended by shaking and adding PLT-poor plasma and then transferred to the storage bags with additive solution (AS) at a ratio of approximately 35% plasma and 65% AS.

Two Amicus devices, Software Version 3.11, set code REF R4R2337, were used for the study. All procedures used a WB:ACD ratio of 11:1 (i.e., 1 part ACD per 11 parts WB) and citrate infusion flow of 1.35 mL/kg/min. The maximum inlet and return rates were 110 and 120 mL/min, respectively.

Trima Accel Version 5.22. Trima Accel (Terumo BCT, Lakewood, CO) is a single-needle, continuous-separation apheresis device. Trima Accel Version 5 has a single-stage

separation channel with all of the blood components flowing in one direction. The blood components separate into layers over the entire circumference according to specific gravity. PLTs are harvested from the component layer between RBCs and plasma, leukoreduced with the process-controlled leukoreduction system, and collected in the final storage container.

Three Trima Accel machines, Version 5.22, Set Code REF 80420, were used for the study. All procedures used a WB:ACD ratio of 11:1 (i.e., 1 part ACD per 10 parts WB) and maximum citrate infusion flow of 1.1 mL/min/L total blood volume. The maximum inlet and return rates were 100 and 140 mL/min, respectively. The PLT concentrates were collected in small amounts of plasma and diluted in AS at the end of the procedure to maintain a ratio of approximately 35% plasma and 65% AS.

Haemonetics MCS+. The Haemonetics MCS+ system (Haemonetics Corp., Braintree, MA) uses intermittent-flow centrifugation to collect plasma, PLTs, WBCs, or RBCs. The grenade-shaped plasmapheresis rotation bowl is used for plasma collection. WB enters the bowl through the stationary tube and forms vertical layers of plasma and RBCs. As the bowl fills, packed cells accumulating on the outer wall displace the plasma inward, pushing it out through the effluent tube. When the bowl is full of RBCs, it must be stopped and emptied before the process can be repeated.

Two Haemonetics MCS+ apheresis machines, Set Code REF 792 P, PLT-poor plasma, were used for the study. All procedures used a WB:ACD ratio of 12:1 (i.e., 1 part ACD per 11 parts WB). The maximum inlet and return rates were 100 and 150 mL/min, respectively.

Preparations of blood components

Plateletpheresis and PLT-plasmapheresis donations were performed on selected donors using Trima and Amicus automatic cell separators. The mean PLT unit volume collected in the plateletpheresis procedures was 300 mL. PLT components containing 3.5×10^{11} were suspended in approximately 35% plasma and 65% PLT AS (PAS IIIM; Terumo BCT). The mean volume of plasma unit collected in the PLT-plasmapheresis procedures was 300 mL. All PLT and plasma components collected were leukoreduced by in-process leukoreduction (leukoreduction system chamber for Trima and elutriation for Amicus).

Plasmapheresis donations were carried out using the Haemonetics MCS+. The mean plasma volume collected was 600 mL, and leukoreduction was performed using a leukoreduction plasma filter (Plasmaflex Plas 4, MacoPharma, Mouvaux, France) at the end of the collection procedure.

A total of eight apheresis procedures were performed from which six plasma and six leukoreduced PLT concentrates were obtained. Three blood donors with detectable

parasitemia in peripheral WB consented to donate blood components by apheresis to study the parasite load. Each blood donor included in the study gave blood components in different donations. The first underwent one plateletpheresis procedure; the second one plasmapheresis and two PLT-plasmapheresis procedures; and the third one plasmapheresis, one plateletpheresis, and two PLT-plasmapheresis procedures. Within the apheresis samples, ten milliliters of GEB was obtained to determine the basal parasitic load (Table 2).

Samples were collected in the BIBB and sent, no more than 2 days after the donation, to the Parasitology Laboratory of the Universitat de Barcelona for molecular analysis. The samples of plasma, PLTs, and GEB were sent at -20°C , at room temperature and 4°C , respectively, and once received were immediately processed for DNA extraction.

Serologic study

The serologic study for detection of specific *T. cruzi* antibodies was performed by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test for qualitative detection of total antibodies to *T. cruzi* in human serum or plasma (Bio-ELISA Chagas, Biokit, Werfen Group, Barcelona, Spain) with recombinant antigen of *T. cruzi* and another commercially available ELISA test system (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) with antigen of a total extract of epimastigotes from *T. cruzi* in BIBB. Confirmation was performed in the Parasitology Laboratory of the Universitat de Barcelona by a third diagnostic method using Western blot with antigen of a total extract of epimastigotes from the *T. cruzi* Maracay strain.¹⁴

Molecular study

DNA extraction

For each sample, DNA was extracted in triplicate (Table 2) from different samples: 200 μL of GEB from all seropositive donors (screening sample), 200 μL of GEB at the moment of apheresis (basal sample), 200 μL of PLT concentrate, and 200 μL of plasma concentrate (the last two obtained by apheresis). The extraction was performed with a PCR template preparation kit (High Pure, Roche, Mannheim, Germany) and eluted in 200 μL of elution buffer according to the manufacturer's instructions. The eluate was stored at -20°C for qPCR analysis. To build the standard curve for quantification of parasitic loads, DNA from a culture of epimastigotes of *T. cruzi* (Maracay strain, 1×10^5 parasite/mL) was extracted in the same way as previously reported.

qPCR assay

Five microliters of extracted DNA was amplified in triplicate by qPCR (Table 2) in a qPCR instrument (LightCycler 480, Roche) device. The primers, probes, and conditions of

TABLE 1. Results of *T. cruzi* serologic screening of blood donors from Chagas-endemic areas living on the Island of Majorca and presence of *T. cruzi* DNA in peripheral WB by qPCR in seropositive blood donors studied

	Argentina	Ecuador	Bolivia	Venezuela	Total
Donors	649	362	106	84	1201
Percentage of donors*	1.42	0.78	0.24	0.19	0.66
Seropositive donors†	4 (0.61)	1 (0.27)	17 (16.03)	1 (1.19)	23 (1.91)
Presence of <i>T. cruzi</i> DNA†	3 (75)	0 (0)	10 (58.8)	1 (100)	14 (60.86)

* Percentage of Latin American donors with respect to the total donor population.

† Data are reported as number (%).

the technique were as described by Piron and coworkers¹⁵ with some modifications. Briefly, the following were used, primers *Cruzi* 1 and *Cruzi* 2 and probe *Cruzi* 3, which was labeled with 6-carboxyfluorescein and minor groove binder. The final concentrations in the PCR mixture were as follows: 1× LightCycler 480 Probes Master (Roche), 750 nmol/L each *T. cruzi* primer, and 250 nmol/L for the *T. cruzi* probe in a 20-μL reaction volume. Detection of the RNase P human gene (0.3× RNase P detection reagents, Life Technologies, Austin, TX) was included as an internal control of amplification in multiplex qPCR, and a non-template sample and DNA from seronegative human blood were included in each run as a negative control.

A sample was considered valid when the internal control was efficiently amplified and was considered positive when the quantification cycle (Cq) was less than or equal to 40 and if at least three of the nine replicates studied for each sample were amplified.¹⁶ A standard curve was constructed with 1-in-10 serial dilutions of total DNA extracted from Maracay strain (1×10^5 - 0.1 parasite equivalents/mL). The parasitic load of every sample was calculated using the LightCycler 480 software through the second derivative maximum method.

RESULTS

Screening study

From a total of 1201 blood donors coming from Latin America, 23 were *T. cruzi* seropositive by the three serologic tests, which corresponded to 1.91% of prevalence with respect to the total donor population. The Bolivian population with 16.03% (17 of 106; 95% confidence interval [CI], 10.1-24.2) seropositivity had the highest prevalence (Table 1).

Parasite DNA was detected in peripheral WB by qPCR in 14 of the 23 seropositive donors, which corresponds to 60.86% (95% CI, 40.7-77.9) positivity in chronic patients (Table 1). The mean ± SD Cq in these screening samples (GEB) was 34.35 ± 2.87, which implies a parasitic load of 0.39 ± 0.2 parasite equivalents/mL.

Apheresis blood components study

The qPCR study of the PLTs indicated that all samples amplified with 100% positivity in all the extractions (18 of 18) and 100% positivity in all replicates performed (54 of

54), with a significant mean ± SD parasitemia of 5.33 ± 6.12 parasite equivalents/mL. In contrast, parasitemia was undetectable in all extract from plasma samples with 0% positivity in all the extractions (0 of 18) for parasite DNA, with 0% of amplification in all replicates (0 of 54). The peripheral WB (basal sample) obtained on the day of plasma and PLT donation by apheresis showed that all samples were positive with a mean ± SD parasitemia of 0.42 ± 0.32 parasite equivalents/mL (Table 2), although not all the replicates amplified in five extractions (59 of 72 replicates amplified by qPCR, 81.9%; 95% CI, 71.3-89.2).

DISCUSSION

Blood transfusion is the second most common mechanism for the transmission of *T. cruzi* in endemic areas and the first in nonendemic areas. The transfusion transmission risk of Chagas disease is thought to depend on multiple factors, including the level of parasitemia in the donor, the type of component transfused, and perhaps the strain of the parasite.^{17,18} In Spain, of the reported cases of *T. cruzi* transfusion transmission, all the patients were transfused with PLT concentrates and all the donors implicated in the donation originated from Chagas-endemic areas,⁴ three of the four donors from Bolivia and one from Brazil.

The serologic screening performed in our study in the Balearic Islands showed that 1.91% of the blood donors coming from Chagas-endemic areas were seropositive. The largest Latin American population living in the Balearic Islands originates from Argentina and is the Latin American group that donates blood most often; however, Bolivian donors have the highest positive detection rate for *T. cruzi* at 16.03%. These results are consistent with the 2007 study performed in Catalonia, Spain, by Piron and colleagues,¹⁹ in which the seroprevalence of donors studied was 0.62%, and the highest positive detection rate for *T. cruzi* (10.2%) was in Bolivian blood donors.

The detection of *T. cruzi* by molecular methods, such as by PCR in blood samples, has high specificity and sensitivity. This technique has been successfully used in the diagnosis of acute chagasic disease for more than 15 years;²⁰ however, due to low parasitemia, the sensitivity and reproducibility of the technique decreases in chronic patients. The sensitivities reported in this group of

TABLE 2. Peripheral WB and apheresis blood components from *T. cruzi*-seropositive blood donors and quantification results of parasitic load obtained by qPCR

Sample	Total of DNA extractions by sample*	Total of qPCR replicates†	Positives replicates amplified	Positives samples	Mean Cq‡	Quantification of parasitic load	
						Mean§	Range§
GEB (n = 8)	24	72	59/72	8/8 (100%)	35.0 ± 2.93	0.42 ± 0.32	0.04-0.93
Plasma (n = 6)	18	54	0/54	0/6 (0%)	>40	Nondetectable	Nondetectable
PLTs (n = 6)	18	54	54/54	6/6 (100%)	30.7 ± 2.42	5.33 ± 6.12	0.73-16.73

* Three extractions of DNA of each sample were performed.

† Three replicates of each DNA extracted were amplified by qPCR.

‡ Mean ± SD of all replicates. Value of qPCR expressed in Cq.

§ Expressed in parasites equivalent/mL.

patients are between 20 and 60% and depend on the conditions under which the technique is performed.^{15,21} In our study using a quantitative, validated, highly sensitive real-time PCR we found 60.86% (95% CI, 40.7-77.9) positivity in 23 seropositive blood donors living in the Balearic Islands. This percentage is slightly higher than the 41% found in 2007 by Piron and coworkers¹⁵ in seropositive blood donors in Catalonia and similar to the 56.5% found in 2011 by Schijman and colleagues,²¹ using qPCR in chronic patients from endemic areas.

Low and oscillating parasitemias are described in chronic chagasic patients^{15,21} and are consistent with the results found in peripheral WB in our pool of seropositive donors, a group in which parasitemias were lower than 1 parasite equivalent/mL. In these samples it was observed that not all replicates amplified according to the low or nonexistence of parasites. Consequently, it is strongly recommended that replicates of DNA extractions and qPCR of WB are performed when a diagnosis is made to increase the possibility of finding positives results, especially when working with small volumes of samples.

Our extract from plasma results did not show any positive amplifications of the parasite DNA in any of the donor samples (0/6). By contrast, in the leukoreduced PLT concentrates, we found parasitic load values of 5.33 ± 6.12 parasite equivalents/mL, with a parasitic load range of 0.72 to 16.73 parasite equivalents/mL, more than five times greater than the parasitic load of the peripheral WB. The qPCR results were positive in all samples (6/6) and, interestingly, 100% of qPCR replicates of all samples studied (54/54) were positives. It is possible that this percentage would decrease if no previous screening for the presence of parasite in peripheral WB was performed to select the studied individuals, as in the 2009 study carried out by Dzib and colleagues,²² using a conventional PCR of minicircle kDNA in blood components leukoreduced by centrifugation from 21 units of seropositive donors, which found 50% positivity in PLT concentrates. Results published in 2005 by Coronado and coworkers²³ indicate that the circulating DNA belongs to living parasites and not to circulating DNA from the remains of dead parasites, because this is rapidly degraded. It would be interesting to

study parasite viability to discriminate between viable and nonviable parasites.

Leukoreduction is considered by some authors to be a good method for reducing the *T. cruzi* transfusion transmission risk, but more detailed studies will be needed to confirm this theory. A report published by Hernández-Becerril and colleagues,²⁴ in 2005, studied 70 PLT and RBC components leukoreduced from seropositive blood donors by conventional PCR and hemoculture. However, no parasitemia was detected by either of the methods; this factor could be attributed to the leukoreduction. Similarly, in 2006 Cardo and Asher⁹ reported a filtration assay study in which *T. cruzi* trypomastigotes spiked in plasma remained in the leukoreduction filters as a result of adherence. In 1995, Moraes-Souza and coworkers,¹⁰ using leukoreduction filters in spiked human blood, showed that this process reduced the number of *T. cruzi*. By contrast, in our study, leukoreduction was not entirely effective at eliminating the parasitic load; in fact, the parasite loads detected in PLTs obtained by apheresis were higher than the parasite load in peripheral WB. A study performed by Dzib and coworkers²² in 2009 reported that leukoreduction by centrifugation did not eliminate *T. cruzi* from infected blood units. In fact, they found parasite DNA in RBCs, buffy coat, and PLT concentrates.

Certainly, the risk of *T. cruzi* transmission per infected blood product transfused is estimated to be from 10% to 25%, with PLT products having a much higher risk than RBCs, frozen plasma, or cryoprecipitated products.^{4,9,25} In fact, there have been no reported cases of transfusion transmission through blood components that were frozen and stored at -20°C or RBCs, even though a report published by Martin and coworkers²⁶ in 2014 observed that *T. cruzi* in spiked human blood and in infected culture cells was able to survive long periods of storage at $+4^{\circ}\text{C}$ and -80°C , suggesting that *T. cruzi*-infected blood or tissues stored under these conditions are potentially infectious.

The reason why we detected parasite DNA in PLTs, and not in plasma concentrates obtaining by apheresis from the same donor who was PCR positive in peripheral blood, could be related to the method that apheresis machines use to process WB. Basically, apheresis machines use centrifugation and filtration, the first as a method of

separating and concentrating the selected blood component, through centrifugation that uses differences in specific gravity or density to separate and isolate blood components, and the second, filtration as a method for reducing the WBC count in PLT concentrates (some machines also use elutriation as an alternative to filtration). Filtration takes advantage of differences in particle size to separate and, as has already been stated, centrifugation is based on the specific gravity of blood cells. The trypomastigote form of *T. cruzi* has a size of 16 to 20 μm ¹⁸ and a specific gravity between PLTs and WBCs.^{27,28} According to these data, it is reasonable to think that, since PLTs are concentrated along with WBCs throughout the apheresis procedure, trypomastigotes are concentrated along with WBCs in the PLT fraction rather than in the plasma or RBC fraction. Therefore, the PLT fraction initially collected by apheresis contains WBCs, although it is leukoreduced during the procedure by elutriation or after the procedure by filtration. However, it is important to note that, despite leukoreduction (i.e., $\leq 1 \times 10^6/\text{L}$ WBCs) the level of residual WBCs in leukoreduced PLT concentrates could be up to 1×10^6 per unit according to our national standards. Accordingly, if a considerable number of WBCs are still present in leukoreduced PLT products, it is logical to think that parasites can also remain.

Using laboratory techniques, in seropositive *T. cruzi* blood donors we have seen that PLTs are the component with the main parasitic load; therefore, it could explain what is observed in clinical cases of transfusion transmission of Chagas disease reported in the literature, in which PLT concentrates are the major component implicated in transmission.^{4-9,29} It would be challenging to investigate the role of new pathogen inactivation technologies, in reducing the parasite load in blood components, for example, PLT concentrates, obtained from seropositive *T. cruzi* donors, and to study whether they are effective in these samples, because so far they have only been studied experimentally in blood components spiked with *T. cruzi*.^{30,31}

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge the blood donors for their participation on this study. The authors also thank Martin Hadley-Adams for his invaluable advice on the preparation of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

- Pereira BI, Nazareth C, Malcata L, et al. Transfusion-transmitted protozoal infections: what is the risk in non-endemic countries? *Acta Med Port* 2011;24(Suppl 4):897-906.
- Castro E. Chagas' disease: lessons from routine donation testing. *Transfus Med* 2009;19:16-23.
- Bern C, Montgomery SP, Katz L, et al. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 2008;21:476-82.
- Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion* 2012;52:1913-21.
- Young C, Losikoff P, Chawla A, et al. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion* 2007;47:540-4.
- Cimo PL, Luper WE, Scouros MA. Transfusion-associated Chagas' disease in Texas: report of a case. *Tex Med* 1993;89:48-50.
- Grant IH, Gold JW, Wittner M, et al. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med* 1989;111:849-51.
- Nickerson P, Orr P, Schroeder ML, et al. Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med* 1989;111:851-3.
- Cardo LJ, Asher L. Transfusion medicine illustrated. Electron micrographic study of the removal of *Trypanosoma cruzi* from blood products by leukodepletion filters. *Transfusion* 2006;46:1067-8.
- Moraes-Souza H, Bordin JO, Bardossy L, et al. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease: efficacy of white cell-reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. *Transfusion* 1995;35:723-6.
- Kessler DA, Shi PA, Avecilla ST, et al. Results of lookback for Chagas disease since the inception of donor screening at New York Blood Center. *Transfusion* 2013;53:1083-7.
- Blajchman MA. The clinical benefits of the leukoreduction of blood products. *J Trauma* 2006;60(Suppl 6):S83-90.
- Duffy T, Cura CL, Ramirez JC, et al. Analytical performance of a multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:e2000
- Riera C, Verges M, Iniesta L, et al. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg* 2012; 86:412-6.
- Piron M, Fisa R, Casamitjana N, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007;103:195-200.
- Sabino EC, Lee TH, Montalvo L, et al. Antibody levels correlate with detection of *Trypanosoma cruzi* DNA by sensitive polymerase chain reaction assays in seropositive blood donors and possible resolution of infection over time. *Transfusion* 2013;53:1257-65.
- Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr Opin Hematol* 1998;5:406-11.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet* 2010;375:1388-402.
- Piron M, Vergés M, Muñoz J. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion* 2007;48:1862-8.
- Wincker P, Telleria J, Bosseno MF, et al. PCR-based diagnosis for Chagas' disease in Bolivian children living in an active

- transmission area: comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology* 1997;114:367–73.
21. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, et al. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e931.
 22. Dzib D, Hernández VP, Ake BC, et al. Leukoreduction by centrifugation does not eliminate *Trypanosoma cruzi* from infected blood units. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:235–41.
 23. Coronado X, Ortiz S, Lastra O, et al. Instability of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood lysates: importance for PCR DNA-based diagnosis. *Mol Diagn* 2005;9:35–40.
 24. Hernández-Becerril N, Mejía AM, Ballinas-Verdugo MA, et al. Blood transfusion and iatrogenic risks in Mexico City. Anti-*Trypanosoma cruzi* seroprevalence in 43,048 blood donors, evaluation of parasitemia, and electrocardiogram findings in seropositive. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100:111–6.
 25. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion* 2009;49(Suppl 2):1S–29.
 26. Martin DL, Goodhew B, Czaicki N, et al. *Trypanosoma cruzi* survival following cold storage: possible implications for tissue banking. *PloS One* 2014;9:e95398.
 27. Amato NV, Matsubara L, Lanura PN. Avaliação do sistema quantitativo buffy coat (QBC) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo em modelo experimental murino. *Rev Soc Bra Med Trop* 1996;29:59–61.
 28. Ferreira CS, Bezerra RC, Pinheiro AA. Methylene blue vital staining for *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. *Rev Inst Med Trop* 2006;48:347–9.
 29. Leiby DA, Lenes BA, Tibbals MA, et al. Prospective evaluation of a patient with *Trypanosoma cruzi* infection transmitted by transfusion. *N Engl J Med* 1999;341:1237–9.
 30. Tonnetti L, Thorp AM, Reddy HL, et al. Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and ultraviolet light for whole blood. *Transfusion* 2012;52:409–16.
 31. Cardo LJ, Salata J, Mendez J, et al. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci* 2007;37:131–7. ■

3.2. ARTÍCULO 2

“Why are platelets the most frequently mentioned blood component in Chagas transfusion transmission reports?”

Carta al Editor

¿POR QUÉ LAS PLAQUETAS SON EL COMPONENTE SANGUÍNEO MÁS
FRECUENTEMENTE MENCIONADO EN LOS CASOS DE TRANSMISIÓN
POR TRANSFUSIÓN DE CHAGAS?

**Beatriz Cancino-Faure, Roser Fisa, Cristina Riera, Ibeth Bula, Enrique
Girona-Llobera, Teresa Jimenez-Marco**

Blood Transfusion

2016, 21:1

doi: 10.2450/2016.0280-15

Factor de impacto: 2,372

RESUMEN

Señor Editor: nos gustaría hacer una breve contribución al artículo escrito por Angheben *et al.*, el cual ha sido recientemente publicado en la revista *Blood Transfusion*. Los autores de este artículo realizan una revisión actualizada sobre la enfermedad de Chagas enfocada en medicina transfusional y las actuales estrategias de prevención de la transmisión en áreas no endémicas. En el apartado que trata sobre la transmisión por transfusión de la enfermedad de Chagas, los autores mencionan que todos los componentes sanguíneos, excepto los derivados del plasma son teóricamente capaces de transmitir la infección debido a que las condiciones de almacenamiento permiten la supervivencia del parásito. Aunque los autores señalan que las plaquetas son el componente principalmente asociado a los casos de transmisión por transfusión no especifican la razón de esto. Cancino-Faure y colaboradores, investigaron la razón y la documentaron en un artículo recientemente publicado. Los autores estudiaron la carga parasitaria en plaquetas y plasma obtenidas mediante aféresis de donantes seropositivos para la infección, utilizando una qPCR, y observaron que las plaquetas presentaban 5 veces más parásitos que la sangre total, mientras que no se detectó DNA en ninguno de los plasmas estudiados. Esto lo atribuyen al tamaño y al peso específico de los parásitos, valores similares a la de las plaquetas y leucocitos, lo que hace que se concentren en esta fracción...

Why are platelets the most frequently mentioned blood component in Chagas transfusion transmission reports?

Beatriz Cancino-Faure¹, Roser Fisa¹, Cristina Riera¹, Ibeth Bula¹, Enrique Girona-Llobera^{2,3}, Teresa Jimenez-Marco^{2,3}

¹Laboratory of Parasitology, Biology, Health and Environment Department, Faculty of Pharmacy, Universitat de Barcelona, Barcelona; ²Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Majorca, Balearic Islands; ³IUNICS (Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut), Universitat de les Illes Balears, Majorca, Balearic Islands, Spain

Dear Sir,

We would like to make a brief contribution to the interesting article written by Angheben *et al.*, which was recently published in *Blood Transfus*¹. The authors provide a comprehensive and well-updated review of Chagas disease, focusing on transfusion medicine and the current strategies for preventing disease transmission in non-endemic areas.

In the section of the article dealing with transfusion-transmitted Chagas disease, the authors state that all blood components, except plasma derivatives, are theoretically capable of transmitting the disease, since their storage conditions allow the parasite to survive. Although Angheben *et al.* also mention that platelets are the blood component most often associated with reported cases of transfusion-related transmission, they do not specify why this is so.

Cancino-Faure *et al.* investigated the reason why platelets carry such a high risk of transmitting Chagas disease via transfusion and their findings were recently published in the article, "Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors"². Using a quantitative real-time polymerase chain reaction, these authors studied the *T. cruzi* parasite load in peripheral whole blood, platelets and plasma collected from chronic chagasic blood donors through apheresis donations. They reported that 100% of platelet components of all blood donors were positive for *T. cruzi* DNA, with a parasitic load 5 times higher than in peripheral whole blood, whereas parasite DNA was undetectable in the plasma component. This finding was attributed to the size and specific gravity³ of the trypomastigote form of *T. cruzi*, which is very similar to that of platelets and leucocytes. Thus, during the whole blood processing to obtain blood components, *T. cruzi* concentrates in the platelet fraction and leucocytes, rather than in the plasma fraction. The higher parasitic load found in platelet components, compared to plasma and peripheral whole blood, collected from Chagas-infected blood

donors would, therefore, explain the higher risk of Chagas disease transmission associated with platelet transfusions.

Apart from this brief comment, we would sincerely like to congratulate the authors for their excellent review on Chagas disease and transfusion medicine.

The Authors declare no conflicts of interest.

References

- 1) Angheben A, Boix L, Buonfrate D, et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 2015; **13**: 540-50.
- 2) Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, et al. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfus* 2015; **55**: 1249-55.
- 3) Amato Neto V, Matsubara L, Bustos Lanura PN. [An evaluation of the quantitative buffy coat system (QBC) in the laboratory diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection: a study in an experimental murine model]. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; **29**: 59-61. [In Portuguese.]

Arrived: 23 October 2015 - Revision accepted: 2 November 2015

Correspondence: Roser Fisa
Laboratory of Parasitology, Faculty of Pharmacy
Universitat de Barcelona
Av. Joan XXIII s.n.
E-08028 Barcelona, Spain
e-mail: rfisa@ub.edu

3.3. ARTÍCULO 3

“Where do the *Trypanosoma cruzi* go? The distribution of parasites in blood components from fractionated infected whole blood”

¿DÓNDE VA *TRYPANOSOMA CRUZI*? DISTRIBUCIÓN DE LOS PARÁSITOS
EN LOS COMPONENTES SANGUÍNEOS SEPARADOS MEDIANTE EL
FRACCIONAMIENTO DE SANGRE TOTAL INFECTADA

**Beatriz Cancino-Faure, Roser Fisa, Cristina Riera, Enrique Girona- Llobera,
Teresa Jimenez-Marco**

Transfusion

Aceptado

09.05.2016

doi:10.1111/trf.13687

Factor de impacto: 3,225

RESUMEN

Las plaquetas son el componente sanguíneo con mayor frecuencia involucrado en los casos publicados en la literatura de transmisión por transfusión de *T. cruzi*. Aunque la sangre total y el concentrado de hematíes también han sido documentados como responsables, poco conocimiento se tiene de la distribución del parásito entre los componentes sanguíneos. El objetivo de este estudio fue investigar en qué componente sanguíneo el parásito se concentra después del fraccionamiento clásico de sangre total artificialmente infectada con *T. cruzi*. La carga parasitaria se estudió por qPCR específica de *T. cruzi* sobre la sangre total, la placa leucoplaquetaria, el concentrado de plaquetas, concentrado de hematíes pre- y post-leucorreducción y el plasma. Se encontró que posterior a la separación de la sangre total infectada con $1,5 \times 10^6$ epimastigotes de *T. cruzi* ($2,78 \times 10^3$ parásitos equivalentes/mL), la distribución de la carga parasitaria en los componentes sanguíneos fue desigual. Siendo la placa leucoplaquetaria el componente sanguíneo que presentó la mayor carga parasitaria ($6,94 \times 10^3$ parásitos equivalentes/mL), seguido por el concentrado de hematíes pre-leucorreducidos ($2,51 \times 10^3$ parásitos equivalentes/mL), que presentó un descenso del 99,9% al ser leucorreducidos por filtración. Tanto el plasma como el concentrado de plaquetas, parcialmente leucorreducidos mediante centrifugación, pero no filtrados, presentaron los niveles de carga parasitaria más bajos, teniendo el plasma la menor carga parasitaria de todos los componentes sanguíneos. Existe un notable riesgo de transmisión por transfusión de *T. cruzi* asociado al concentrado de hematíes, por lo que la leucorreducción mediante filtración podría ser una estrategia efectiva en reducir el riesgo por transfusión, especialmente en países endémicos y no endémicos con un alto porcentaje de inmigración de latinoamericanos.

Where do *Trypanosoma cruzi* go? The distribution of parasites in blood components from fractionated infected whole blood

Beatriz Cancino-Faure,¹ Roser Fisa,¹ Cristina Riera,¹
Enrique Girona-Llobera,^{2,3} and Teresa Jimenez-Marco^{2,3}

BACKGROUND: Platelets (PLTs) are the blood component most frequently involved in *Trypanosoma cruzi* transfusion transmission cases reported in the literature, although whole blood (WB) and red blood cells (RBCs) have also been incriminated. However, there is little knowledge of the parasite distribution among blood components.

STUDY DESIGN AND METHODS: The aim of this study was to investigate in which blood component *T. cruzi* parasites concentrate the most, after fractionating artificially *T. cruzi*-infected WB. The *T. cruzi* parasite load was studied by a specific quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) in WB, buffy coat (BC), PLT concentrates, RBCs before and after leukoreduction, and plasma (PL).

RESULTS: The parasite load in WB experimentally infected with 1.5×10^6 parasites (2.78×10^3 parasite equivalents/mL) was unevenly distributed among the separated blood components. The highest level was found in the BC (6.94×10^3 parasite equivalents/mL) and RBCs before leukoreduction by filtration (2.51×10^3 parasite equivalents/mL), after which RBCs presented a 99.9% reduction in parasite levels. Both PL and PLTs, partially leukoreduced by centrifugation but nonfiltered, had low parasite levels, the lowest concentration being in PL.

CONCLUSIONS: The highest parasite concentration was detected in the BC, followed by RBCs before leukoreduction. There is a notable risk of transfusion-transmitted Chagas disease associated with nonleukoreduced RBCs. Leukoreduction may be an effective prevention strategy for transfusion-transmitted *T. cruzi* infection, especially in endemic countries and in nonendemic countries with a high rate of immigration from Latin America.

Transfusion transmission of the *Trypanosoma cruzi* parasite is one of the most frequent transmission mechanisms of Chagas disease.¹ Infection by blood transfusion has decreased in endemic countries, chiefly due to the implementation of universal screening of blood donors. However, with the increase of migration from endemic to nonendemic countries, a new global scenario has emerged for this transmission mechanism. Transfusion transmission Chagas cases have been reported in the United States, Spain, and other countries in Europe, Asia, and Oceania.^{2,3} Strategies to prevent the risk of transfusion transmission have been

ABBREVIATIONS: BC = buffy coat; PL = plasma; PRT(s) = pathogen reduction technology(-ies); qPCR = quantitative real-time polymerase chain reaction.

From the ¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Catalonia, Spain; and the ²Fundació Banc de Sang i Teixits de las Illes Balears; and the ³IUNICS Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Majorca, Balearic Islands, Spain.

Address reprint requests to: Roser Fisa, Laboratori de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s.n. E-08028, Barcelona, Spain; e-mail: rfisa@ub.edu.

This work is part of a research study supported by the National R&D+i Plan 2008-2011 and ISC III-Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación (PI 10/00533), was in part funded by CONICYT/Becas Chile (72130155), and is part of the Generalitat de Catalunya 2014 SGR 1241 program.

Received for publication March 11, 2016; revision received May 9, 2016; and accepted May 9, 2016.

doi:10.1111/trf.13687

© 2016 AABB

TRANSFUSION 2016;00:00–00

implemented in some of the nonendemic countries, such as selective screening of blood donors, with temporary deferral or permanent exclusion of those at risk, but in others, policies to control Chagas disease are not fully applied.⁴⁻⁶ Improvements have also been made to reduce adverse reactions to transfusion and decrease the risk of transfusion-transmitted infections without altering the quality of blood components. The effectiveness of leukoreduction of blood components in reducing the risk of pathogen transmission has been studied, and pathogen reduction technologies (PRTs) are currently in development.⁷

A review of the literature reveals that platelet (PLT) concentrates are the blood component most frequently identified as responsible for the transmission of *T. cruzi* by transfusion. However, in cases of whole blood (WB) transfusion its responsibility has not been clearly identified.⁸ Recently, a case of transfusion transmission involving red blood cells (RBCs) has been described.⁹

The development of sensitive and specific molecular tools based on polymerase chain reaction (PCR) methods has improved the detection of *T. cruzi*, with regard to less sensitive methods like direct detection or parasite culture.¹⁰ Real-time PCR is a relatively new technology that allows the parasite load in a sample to be quantified in a specific manner.¹¹ The aim of this study was to investigate the quantitative distribution of the *T. cruzi* parasite by a specific quantitative real-time PCR (qPCR) in blood fractions (buffy coat [BC], PLTs, RBCs before and after leukoreduction by filtration, and plasma [PL]) obtained from a WB unit experimentally infected with *T. cruzi* epimastigotes. The effectiveness of prestorage leukoreduction by filtration as a means to reduce the parasite load in RBCs was also investigated.

MATERIALS AND METHODS

This study was approved by the ethical committees of the participating institutions, the Balearic Island Ethics Committee and the Research Ethics Committee of the University of Barcelona. Written informed consent was obtained from the participating donors.

A culture of *T. cruzi* epimastigotes of the Maracay strain in liver infusion tryptose medium was maintained at 28°C until the logarithmic growth phase. Twenty milliliters of the culture was centrifuged at $1800 \times g$ for 10 minutes; the pellet was suspended in the same medium and viable parasites were counted in a Rosenthal hemocytometer chamber with trypan blue dye. The stock was prepared to 1×10^6 parasites/mL in liver infusion tryptose.

A WB unit was obtained for the study from a healthy blood donor seronegative for Chagas disease, selected after a serologic study with two different enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; Bio-ELISA Chagas, Biokit, Werfen Group; Ortho Clinical Diagnostics), and confirmed

by an in-house Western blot.¹² The bag system used for collecting the WB unit was a top-and-bottom system (CompoFlow 4F, Fresenius Kabi), which is a 4-bag CPD/SAG-M 450-mL system with a leukoreduction filter in line for RBCs (REF CQ32250, Fresenius Kabi AG). The WB unit (537 mL) was experimentally infected with 1.5 mL (1×10^6 parasites/mL) of the aforementioned parasite stock of living *T. cruzi* epimastigotes by sterile connection. The WB unit was centrifuged at $4138 \times g$ for 15 minutes to 20°C and blood components were separated immediately after centrifugation. Blood components were separated into PL, BC, and RBCs by means of an automatic separator instrument (CompoMat G5, Version 3.00.14, Fresenius Kabi AG). The RBC component was leukoreduced before storage by filtration (RBC flexible filter, Fresenius Kabi AG). The BC from the experimentally infected WB unit was centrifuged at $632 \times g$ for 6 minutes to 22°C to obtain PLTs (Fig. 1).

DNA was extracted from 200 μ L of different samples: WB, PL, BC, RBCs before and after leukoreduction, and PLTs. For each sample, the DNA extraction was performed in triplicate with a PCR template preparation kit (High Pure, Roche), eluted in 200 μ L of elution buffer according to the manufacturer's instructions and stored at -20°C for qPCR analysis. DNA from a culture of *T. cruzi* epimastigotes (Maracay strain, 1×10^5 parasites/mL) was extracted as above to build a standard curve.

Five microliters of extracted DNA was amplified by a specific *T. cruzi* qPCR in a thermocycler (LightCycler 480, Roche) in triplicate. The primers, probes, and conditions of the technique were as previously described by Piron and coworkers¹¹ with some modifications. Briefly, the following were used: Cruzi 1 and Cruzi 2 primers and a Cruzi 3 probe, which was labeled with 6-carboxyfluorescein and a minor groove binder. The final concentrations in the PCR mixture were as follows: $1 \times$ LightCycler 480 probes master (Roche), 750 nmol/L each *T. cruzi* primer and 250 nmol/L of the *T. cruzi* probe in a 20 μ L reaction volume. Cycling conditions were a first step at 50°C for 2 minutes and 95°C for 10 minutes, followed by 45 cycles at 95°C for 15 seconds and 58°C for 1 minute. All amplified samples were considered positive and expressed in the quantification cycle. A standard curve was constructed with 1/10 serial dilutions in elution buffer (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.5) of total DNA extracted from the Maracay strain (1×10^5 –1 parasite/mL). The parasitic load of every sample was calculated using LightCycler 480 software by the second derivative maximum method and expressed in parasite equivalents/mL. Molecular biology-grade water (Sigma-Aldrich) and a nontemplate sample were used as a negative control.

The data were analyzed with computer software (SPSS Statistics, IBM Corp.). Comparisons were carried out with a one-way analysis of variance and post hoc Tukey honest significant difference test. Differences with *p* values of less than 0.05 were considered significant.

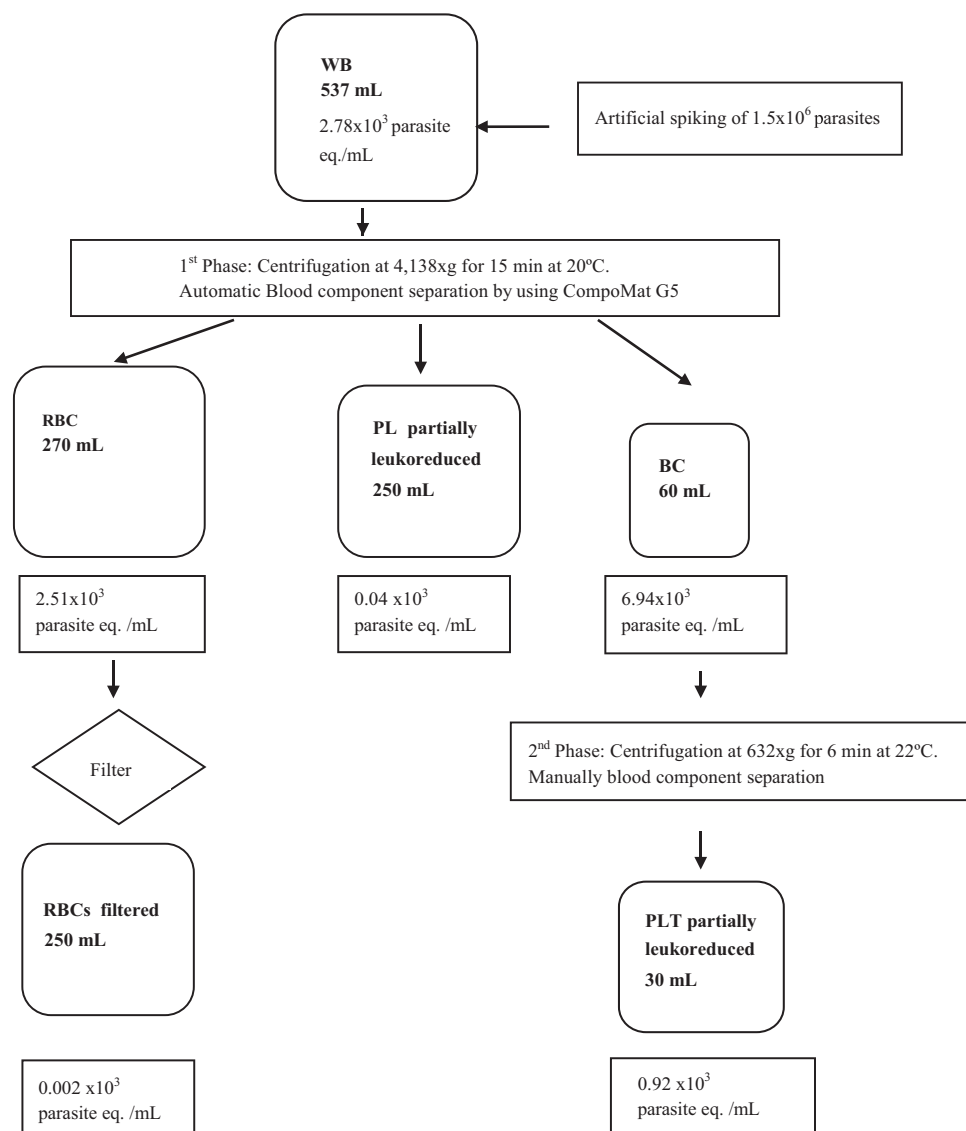


Fig. 1. Description of the separation process of a spiked *T. cruzi* WB unit and parasite concentration in each blood component measured by qPCR and expressed in parasite equivalents/mL.

RESULTS

The parasitic load of each blood component was analyzed by qPCR; each value represented a mean of nine analyses. After fractioning the spiking WB unit (2.78×10^3 parasite equivalents/mL), the highest concentration of parasites was observed in the BC fraction (6.94×10^3 parasite equivalents/mL), which was 2.5-fold higher than in WB (+149.6%). The almost 10% lower parasite concentration in nonleukoreduced RBCs compared to WB (2.51×10^3 parasite equivalent/mL) was related to the dilution effect of 100 mL of SAG-M added to the RBCs, which must be taken into account. Considering the RBC volume (270 mL), the RBCs were the blood component with the greatest absolute

number of parasites (677×10^3). However, after filtration, a striking and significant decrease of the parasite concentration was observed in the RBCs (0.002×10^3 parasite equivalents/mL), which represents a 99.9% reduction on the preleukoreduced RBC parasite load ($p < 0.001$). PLTs obtained by centrifugation of the BC, and hence partially leukoreduced (0.92×10^3 parasite equivalents/mL), showed 86.7 and 66.9% reduction compared to the BC and WB parasite concentrations, respectively. PL obtained by centrifugation of WB showed the lowest parasite concentration (0.04×10^3 parasite equivalents/mL) with a reduction of 98.4% with respect to the WB parasite load (Table 1 and Fig. 1).

TABLE 1. *T. cruzi* concentrations achieved by qPCR in the blood components obtained after fractionation and leukoreduction of the experimentally spiked WB unit

Blood component	Mean Cq*	Parasite equivalents/mL	Percentage of reduction or increment of parasite concentration in the blood components		
			WB	RBCs	BC
WB	21.43 ± 0.30	2.78 × 10 ³	100		
BC	20.00 ± 0.21	6.94 × 10 ³	+149.6		100
RBCs	21.58 ± 0.19	2.51 × 10 ³	-9.7		
PLT partially leukoreduced	23.13 ± 0.13	0.92 × 10 ³	-66.9		-86.7
PL partially leukoreduced	27.88 ± 0.20	0.04 × 10 ³	-98.4		
RBCs filtered	32.45 ± 0.40	0.002 × 10 ³	-99.9	-99.9	

*Cq = quantification cycle obtained from a mean of nine analyses ± standard deviation.

DISCUSSION

Donor screening and infectious disease marker testing have significantly reduced the incidence of transfusion-transmitted diseases and improved the safety of blood supply. However, patients are still at risk of infection from asymptomatic yet infectious donors. In the case of Chagas disease, it has been suggested that transfusion transmission of *T. cruzi* may be significantly underreported,^{8,13} since the infection is often subclinical and therefore not detectable. Hence, the importance of implementation of all available tools to try to prevent such infections by blood transfusion.

Transfusion medicine has been improved by leukoreduction of blood components, which can remove several pathogens, since distinct white blood cell subpopulations may harbor particular transfusion-transmissible infectious agents. For instance, monocytes contain viral DNA in asymptomatic carriers of latent cytomegalovirus,¹⁴ human T-lymphotropic viruses Types I and II,¹⁵ rickettsial species like *Orientia tsutsugamushi*,^{16,17} and trypanosomatids such as *Leishmania* protozoans.¹⁸⁻²⁰ These intracellular monocyte pathogens can be removed from infected blood products by leukoreduction filters. Although *T. cruzi* is not present as an intracellular organism in peripheral blood, leukoreduction filters have also proved to be efficient as a means of reducing its load in infected blood. An interesting experimental study showed that trypomastigotes can adhere to leukoreduction filter fibers and become trapped.²¹

A review of the literature indicates that PLTs are the blood component most frequently involved in the transmission of *T. cruzi* by transfusion. In our study, the parasites were detected mainly in the BC and RBCs. The high concentration of parasites found in these components is of particular significance and could explain some of the cases in the literature where PLTs were prepared from pooled BC. Even after PLTs were partially leukoreduced through centrifugation, which led to a decrease in parasite concentration, a nonnegligible number of parasites remained. The risk associated with PLTs was noted in a

previous study by our research group with seropositive Chagas disease blood donors, in which PL and PLT components were obtained by apheresis and leukoreduced by elutriation: *T. cruzi* parasites were detected in PLTs at concentrations fivefold higher than in peripheral WB, while none were found in PL.²² In this study, the PL obtained by WB centrifugation contained a minimum amount of *T. cruzi*, which theoretically could be eliminated by filtration.

There is little information in the literature on whether other blood components, such as RBCs, might transmit Chagas disease, and very few studies have explored the risk associated with this blood component. In our results, RBCs had the second highest concentration of parasites and would therefore carry a high risk of transfusion transmission of Chagas disease if not leukoreduced. The first published case of transmission of *T. cruzi* infection through RBC transfusion occurred recently in Belgium, involving a boy with sickle cell disease.⁹ However, the authors did not mention in their article whether or not the transfused RBCs had been leukoreduced or, if so, whether it was pre- or poststorage filtration. This missing information is crucial, since according to our results, RBC leukoreduction by filtration reduces the *T. cruzi* concentration by 99.9%. Something similar was reported by Moraes-Souza and colleagues²³ when they investigated the efficacy of leukoreduction filters in removing *T. cruzi* from infected WB by microscopic enumeration *in vivo* and *in vitro*. They found that filters were effective in reducing the number of parasites in *T. cruzi*-infected blood, especially when the parasites were present in a low number.

In this study, all the blood components derived from the artificially *T. cruzi*-contaminated WB unit contained parasites, but in different concentrations. Related findings were reported by Dzib and coworkers²⁴ in a study of centrifugation as a leukoreduction method. The presence of *T. cruzi* DNA was analyzed by conventional PCR and positivity was reported in 62% of the RBC fractions, 60% of the BC, and 50% of the PLTs from blood collected from

Chagas-seropositive donors. Thus, BC removal by centrifugation as a leukoreduction method does not entirely eliminate *T. cruzi* from RBCs and PLTs, maintaining the risk of transmission. For the reasons formerly mentioned, we consider that the processing method and leukoreduction filters types used, affect the characteristics of the blood component, which in this case is directly related with the number of parasites present in the leukoreduced blood.

Since most chronic Chagas patients do not have symptoms and are consequently unaware of their disease, there is a high risk if they will donate blood in blood banks without strategies to prevent *T. cruzi* transfusion transmission. The amount of parasites circulating in WB in chronic patients is low, approximately 1 parasite equivalent/mL or less,^{22,25} which represents an important limitation when studying a population of chronic patients. The difficult task of detecting circulating parasites in blood becomes even harder after the blood is fractionated. For these reasons, the current work was conceived as an in vitro study, in which WB was spiked with relatively high concentrations of epimastigotes. This allowed us explore the distribution of *T. cruzi* after fractionation and evaluate the efficiency of leukoreduction filtration in reducing the parasite concentration.

In addition to blood donor screening, in endemic and nonendemic countries with a high rate of immigration from Latin America, universal leukoreduction^{26,27} implementation may be an effective prevention strategy for the transfusion transmission of Chagas disease. However, the major disadvantage associated with universal leukoreduction is the cost²⁸ and there is controversy related to its implementation worldwide.²⁹ Since there is a notable risk of transfusion-transmitted Chagas disease associated with nonleukoreduced RBCs, leukoreduction may be an effective prevention strategy for transfusion-transmitted *T. cruzi* infection, within other prevention strategies, such as PRTs, which could be useful to eliminate the infection risk of RBCs, but currently PRT can only be applied to PLTs and PL. Nevertheless, research studies on RBCs³⁰ and WB³¹ treated with PRT are obtaining promising results.

ACKNOWLEDGMENTS


We acknowledge the blood donors for their participation on this study. The authors also thank Lucy Brzoska for her invaluable advice on the English preparation of the manuscript.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have disclosed no conflicts of interest.

REFERENCES

1. Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014;109:856-62.
2. Rodrigues Coura J, Albajar Viñas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010;465:s6-7.
3. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions—a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015;110:277-82.
4. Supply of blood for transfusion in Latin American and Caribbean countries 2012 and 2013. Washington (DC): Pan American Health Organization; 2015.
5. Rojo Medina J. Enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión. *Panorama internacional y en México. Gac Med Mex* 2014;150:78-83.
6. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, et al. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus* 2015;13:540-50.
7. Aubuchon JP. Update on the status of pathogen inactivation methods. *ISBT Sci Ser* 2011;6:181-8.
8. Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: evidence in support of transfusion transmission. *Transfusion* 2012;52:1913-21.
9. Blumental S, Lambermont M, Heijmans C, et al. First documented transmission of *Trypanosoma cruzi* infection through blood transfusion in a child with sickle-cell disease in Belgium. *PLoS Negl Trop Dis* 2015;9:e0003986.
10. Britto C, Cardoso MA, Monteiro V, et al. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 1995;110:241-7.
11. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 2007;103:195-200.
12. Riera C, Verges M, Iniesta L, et al. Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg* 2012;86:412-6.
13. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion* 1991;31:547-57.
14. Taylor-Wiedeman J, Sissons JGP, Borysiewicz LK, et al. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol* 1991;72:2059-64.
15. Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Human T-lymphotropic virus and transfusion safety: does one size fit all? *Transfusion* 2016;56:249-60.
16. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715-27.
17. Mettelle FC, Salata KE, Belanger KJ, et al. Reducing the risk of transfusion-transmitted rickettsial disease by WBC filtration,

- using *Orientia tsutsugamushi* in a model system. *Transfusion* 2000;40:290-6.
18. Kyriakou DS, Alexandrakis MG, Passam FH, et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in endemic areas? *Transfus Med* 2003;13:59-62.
 19. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 2008;48:1383-9.
 20. Cardo LJ, Salata J, Harman R, et al. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside. *Transfusion* 2006;46:896-902.
 21. Cardo LJ, Asher L. Electron micrographic study of the removal of *Trypanosoma cruzi* from blood products by leukodepletion filters. *Transfusion* 2006;46:1067-8.
 22. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, et al. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion* 2015;55:1249-55.
 23. Moraes-Souza H, Bordin JO, Bardossy L, et al. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease: efficacy of white cell-reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. *Transfusion* 1995;35:723-6.
 24. Dzib D, Hernández VP, Ake BC, et al. Leukoreduction by centrifugation does not eliminate *Trypanosoma cruzi* from infected blood units. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 2009;9:235-41.
 25. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e419.
 26. Wilkinson SL, Lipton KS. Leukocyte reduction. Association Bulletin #99-7. Bethesda (MD): American Association of Blood Banks; 1999.
 27. Guide to the preparation, use and quality assurance of blood components. 18th ed. Strasbourg: Council of Europe; 2015.
 28. Custer B, Agapova M, Martinez RH. The cost-effectiveness of pathogen reduction technology as assessed using a multiple risk reduction model. *Transfusion* 2010;50:2461-73.
 29. Thurer RL, Luban NL, AuBuchon JP, et al. Universal WBC reduction. *Transfusion* 2000;40:751-2.
 30. Winter KM, Johnson L, Kwok M, et al. Red blood cell in vitro quality and function is maintained after S-303 pathogen inactivation treatment. *Transfusion* 2014;54:1798-807.
 31. Schubert P, Culibrk B, Karwal S, et al. Whole blood treated with riboflavin and ultraviolet light: quality assessment of all blood components produced by the buffy coat method. *Transfusion* 2015;55:815-23. 

3.4. ARTÍCULO 4

“The effectiveness of riboflavin and UV light pathogen reduction technology in eliminating *Trypanosoma cruzi* from leukoreduced whole blood”

EFFECTIVIDAD DE LA TECNOLOGÍA DE REDUCCIÓN DE PATÓGENOS
BASADA EN RIBOFLAVINA-LUZ UV EN ELIMINAR *TRYPANOSOMA CRUZI*
EN SANGRE TOTAL LEUCORREDUCIDA

**Teresa Jimenez-Marco*, Beatriz Cancino-Faure*, Cristina Riera,
Enrique Girona-Llobera, Roser Fisa**

*Ambos autores han contribuido de igual manera a este trabajo

Transfusion

(En proceso de revisión)

Factor de impacto: 3,225

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido por un insecto vector. Existen otras vías de transmisión tanto en áreas endémicas como no endémicas como el trasplante de órganos y médula ósea, transmisión vertical o a través de la transfusión de sangre y sus componentes. Los pacientes asintomáticos crónicos pueden presentar niveles de parásitos en sangre periférica fluctuantes y bajos, por lo que eventualmente podrían transmitir la infección vía donación de sangre. En este estudio se ensayó la capacidad de la tecnología de reducción de patógenos, que emplea riboflavina y luz UV, para eliminar *T. cruzi* de unidades de sangre artificialmente contaminadas. Este método se basa en el daño permanente del material genético del agente patógeno. Las unidades de sangre total contaminadas con epimastigotes de *T. cruzi*, fueron leucorreducidas mediante filtración y tratadas con riboflavina y luz UV. Los niveles de reducción del parásito fueron cuantificados mediante q-PCR y RT-qPCR. La cuantificación de RNA (cDNA) parasitario, mostró una reducción de la concentración de *T. cruzi* por encima del 99% posterior a la leucorreducción y una reducción completa (100%) después del tratamiento con riboflavina y luz UV. Esto demuestra que ambos procedimientos utilizados en junto son capaces de eliminar por completo cantidades significativas de *T. cruzi* en sangre total, por lo que se propone el uso de ambas estrategias de forma combinada, junto a otras medidas ya implementadas en los bancos de sangre para prevenir la transmisión de la enfermedad de Chagas por la vía transfusional.



**THE EFFECTIVENESS OF RIBOFLAVIN AND UV LIGHT
PATHOGEN REDUCTION TECHNOLOGY IN ELIMINATING
TRYPANOSOMA CRUZI FROM LEUKOREDUCEED WHOLE
BLOOD**

Journal:	<i>Transfusion</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Jimenez-Marco, M ^a Teresa; Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Apheresis Department Cancino-Faure, Beatriz; Universitat de Barcelona, Microbiologia i Parasitologia Sanitaries Girona-Llobera, Enrique; Fundacio Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Blood Component Riera, Cristina; Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia, Laboratori de Parasitologia Fisa, Roser; Universitat de Barcelona. Facultat de Farmàcia, Laboratori de Parasitologia
Key words:	Transfusion-transmitted Disease - Other

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

THE EFFECTIVENESS OF RIBOFLAVIN AND UV LIGHT PATHOGEN REDUCTION TECHNOLOGY IN ELIMINATING *TRYPANOSOMA CRUZI* FROM LEUKOREduced WHOLE BLOOD

11
12
13
14

Teresa Jimenez-Marco^{1,2*}, Beatriz Cancino-Faure^{3*}, Enrique Girona-Llobera^{1,2}, Cristina Riera³, Roser Fisa³

15
16

1 Fundació Banc de Sang i Teixits de las Illes Balears. Majorca, Spain.

17
18
19

2 IUNICS Institut Universitari d' Investigació en Ciències de la Salut. Universitat de les Illes Balears, Spain.

20
21
22

3 Laboratori de Parasitologia, Departament de Biologia, Sanitat i Medi Ambient. Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona. Barcelona, Spain.

23
24

* Authors contributed equally to this work.

25
26
27
28

Corresponding author: Teresa Jimenez-Marco. Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears. C/ Rosselló y Caçador, 20. Palma de Mallorca 07004. Spain. Fax: +34-971764280/Phone: +34-971-764433.

29
30
31

Address reprint request to: Teresa Jimenez-Marco

32
33

Word count text: 3.057

34
35

Word count abstract: 248

36
37

Figures: 2

38
39

References count: 36

40 41 42

SOURCE OF SUPPORT

43
44
45
46
47
48
49

This work is part of a research study supported by the National R&D+i Plan 2008-2011 and ISC III -Subdirección General de Evaluación y Fomento de la Investigación (PI 10/00533), was in part funded by CONICYT/Becas Chile (72130155) and is part of the Generalitat de Catalunya 2014 SGR 1241 program. Terumo BCT has also collaborated in this research study by providing the equipment and the materials for the experiments.

50 51 52

DISCLOSURE OF CONFLICTS OF INTEREST

53
54
55

The authors have disclosed no conflicts of interest.

56
57
58
59
60

Short running head: Riboflavin-UV light eliminates *T. cruzi*

ABSTRACT

BACKGROUND: The tropical parasitic Chagas disease is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is mainly transmitted by insect vectors. Other infection routes, both in endemic and non-endemic areas, include organ and bone marrow transplantation, congenital transmission and blood transfusion. Asymptomatic chronic chagasic individuals may have a low and transient parasitemia in peripheral blood, and consequently, they can unknowingly transmit the disease via blood transfusion. Riboflavin and UV light pathogen reduction is a method to reduce pathogen transfusion-transmission risk based on damage to the pathogen nucleic acids.

STUDY DESIGN AND METHODS: In this study, we tested the effectiveness of this technology for the elimination of *T. cruzi* parasites in artificially contaminated whole blood units (WBUs), and thus for decreasing the risk of Chagas disease transfusion-transmission. The contaminated WBUs were leukoreduced by filtration and treated with riboflavin and UV light. The level of pathogen reduction was quantified by a real time polymerase chain reaction (q-PCR) and a real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), as viability assay.

RESULTS: The RNA (cDNA) quantification of the parasites, showed a reduction of the concentration of *T. cruzi* parasites, above 99% after leukoreduction, and a complete reduction (100%) after the riboflavin and UV light treatment.

CONCLUSION: Our study demonstrates that riboflavin and UV light treatment and leukoreduction used in conjunction are able to entirely eliminate relevant amounts of *T. cruzi* in whole blood. Both strategies could complement other blood bank measures already implemented to prevent the transmission of Chagas disease via blood transfusion.

INTRODUCTION

Chagas disease, or *American trypanosomiasis*, is a tropical parasitic disease caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. Considered a neglected tropical disease or a disease of poverty, Chagas is endemic in 21 countries of the Americas. In endemic areas the parasite is mostly transmitted to humans and other mammals by the blood-sucking bugs of the subfamily Triatominae, when the infected feces of the vector are inoculated through a bite site or through an intact mucous membrane of the mammalian host.¹⁻² However, in both endemic and non-endemic areas, *T. cruzi* can also be acquired through other routes, including blood transfusion,³ organ and bone transplantation,⁴ and congenital transmission from mother to child.⁵

Chagas disease has two clinical forms or phases: acute and chronic. All patients infected with *T. cruzi* enter the acute phase, characterized by flu-like symptoms that are often mild, and may even go unnoticed. During the acute phase, a high number of parasites circulate in the blood. The subsequent chronic phase usually takes an indeterminate asymptomatic form in 70-80% of infected individuals, while in 20-30% it causes damage in the tissue of the heart, digestive system and/or nerve system.^{1,2} Due to a low and transient parasitemia in the peripheral blood of asymptomatic chronic individuals,^{6,7} even decades after the infection, the infectious status can go undetected, thereby creating a risk of disease transmission by blood transfusion.³ Moreover, studies have shown that *T. cruzi* is able to survive under blood bank component storage conditions (4°C, 22°C), as well as in fresh-frozen plasma and cryopreserved blood components, making *T. cruzi* a potential threat for blood safety.^{8,9}

In this study, we tested the ability of the riboflavin and UV light pathogen reduction technology (riboflavin UV-PRT) (Mirasol Pathogen Reduction Technology System; Terumo BCT, Lakewood, CO, USA), which prevents pathogen replication by irreversible nucleic acid damage, to reduce

1
2
3 viable and infectious *T. cruzi* load in leukoreduced whole blood, and consequently reduce the risk
4
5 of Chagas disease transfusion-transmission.
6
7

8
9 It has been previously shown that riboflavin and UV light treatment can decrease *T. cruzi* growth in
10 plasma and platelets¹⁰ and in non-leukoreduced whole blood.¹¹ However, until now, the
11 effectiveness of riboflavin-UV-PRT in eliminating *T. cruzi* from leukoreduced whole blood has not
12
13 been demonstrated.
14
15

16
17 The evaluation was carried out in *in vitro* experiments in which *T. cruzi* epimastigotes were spiked
18 into whole blood units (WBUs). The artificially contaminated blood products were leukoreduced by
19 filtration and treated with the riboflavin-UV-PRT. The level of pathogen reduction was quantified
20
21 by a real time polymerase chain reaction (q-PCR) and a real time reverse transcription polymerase
22
23 chain reaction (RT-qPCR).
24
25
26
27

28
29 The data presented here represent the only study testing of the combined efficiency of
30 leukoreduction filtration and riboflavin-UV light PRT treatment to reduce the *T. cruzi* load in whole
31
32 blood. Parasite viability was determined by a highly sensitive method based on a real time reverse
33
34 transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR).
35
36
37

38 39 **MATERIALS AND METHODS**

40
41
42 Blood selection: Two WBUs were obtained from healthy blood donors seronegative for Chagas
43 disease, selected after a serological study with two different ELISA: Bio-ELISA Chagas assays
44 (Biokit, Werfen Group, Barcelona, Spain), Ortho Clinical Diagnostics (Raritan, NJ). This study was
45
46 approved by the ethical committees of the participating institutions, the Balearic Islands Ethics
47
48 Committee and the Research Ethics Committee of the University of Barcelona. Written informed
49
50 consent was obtained from the participating donors.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 Culture of *T. cruzi*: A culture of *T. cruzi* epimastigotes of the Maracay strain in liver infusion
4 tryptose (LIT) medium was maintained at 28°C until the logarithmic growth phase. The culture was
5 centrifuged at 1800xg for 10 min; the pellet was suspended in the same medium and viable parasites
6 were counted in a Rosenthal hemocytometer chamber with trypan blue dye. The stock prepared
7 (1x10⁶ parasites/mL) in LIT was equally divided to make two sets of parasite suspension. One set of
8 parasites was used for live parasite studies and the other set was subjected to inactivation by
9 exposure to 80°C for 30 min in a water bath.
10
11
12
13
14
15
16
17

18
19 Whole blood infection was performed as follows: two WBUs obtained from two healthy blood
20 donors, both seronegative for Chagas disease, were used for the study. The WBUs (537 mL) were
21 experimentally infected using a sterile connection with 4.5 mL (1x10⁶ parasites/mL) of the
22 aforementioned *T. cruzi* stock, one WBU with live and the other with dead epimastigotes. The
23 WBUs were pre-storage leukoreduced by filtration (CompoFlow CQ 31451 with whole blood filter,
24 Fresenius-Kabi AG. 61346 Bad Homburg, Germany). The treatment with riboflavin-UV-PRT was
25 performed according to the manufacturer's instructions¹²: the blood from the two leukoreduced
26 WBUs was transferred to two illumination bags. After addition of 35 mL of riboflavin and removal
27 of the residual air, the WB was gently mixed and a 20-mL sample was removed for testing and
28 measurement of hematocrit (Hct). WBUs were illuminated with 80 J mLRBC-1 of UV light (280-
29 400nm) for at least 45 min. An aliquot of 20 mL blood was kept for RNA and DNA extraction from
30 each WBU, before and after the application of leukoreduction and riboflavin-UV-PRT to the
31 artificially infected WBUs, one with living and the other with dead epimastigotes.
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 DNA extraction: The DNA of the infected WBU, the infected and leukoreduced WBU, and the
49 infected leukoreduced and riboflavin-UV-PRT-treated WBU were extracted in triplicate with the
50 High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Mannheim, Germany), eluted in 200 µL of
51 elution buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.5) according to the manufacturer's instructions, and stored at
52 -20°C for qPCR analysis. For the extraction negative control (ENC), a blood sample was used
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 without a template. To build the standard curve for the quantification of parasite loads, DNA from a
4
5 culture of *T. cruzi* epimastigotes (Maracay strain, 1×10^5 parasites/mL) was extracted as described
6
7 above.
8

9
10 RNA extraction: In parallel with DNA extraction, 200 μ L of the same samples was submitted to
11
12 RNA extraction in triplicate. The extraction was performed with Rneasy mini kit (Qiagen, Hilden,
13
14 Germany); DNase I was used in the protocol for removal of the genomic DNA and the RNA was
15
16 eluted in 30 μ L of water (RNase free) according to the manufacturer's instructions for the
17
18 purification of total RNA of animal cells. The eluate was stored at -80°C for RT-qPCR analysis. For
19
20 the ENC, a blood sample was used without a template. To build the standard curve for
21
22 quantification of parasite loads, RNA from a culture of *T. cruzi* epimastigotes (Maracay strain,
23
24 1×10^5 parasites/mL) was extracted as described above.
25
26
27
28

29 Real time PCR assay (qPCR): Five μ L of extracted DNA was amplified by qPCR in a thermocycler
30
31 (LightCycler 480, Roche, Mannheim, Germany) in triplicate. The primers, probes and conditions of
32
33 the technique were as described by Piron et al¹³ with some modifications. Briefly, the following
34
35 were used: Cruzi 1 and Cruzi 2 primers, and a Cruzi 3 probe labelled with 6-carboxyfluorescein and
36
37 a minor groove binder. The final concentrations in the PCR mixture were as follows: 1X
38
39 LightCycler 480 Probes Master (Roche, Mannheim, Germany), 750 nM of each *T. cruzi* primer and
40
41 250 nM of the *T. cruzi* probe in 20 μ L reaction volume. The amplification was run in 45 cycles and
42
43 the annealing temperature was 58°C. A standard curve was constructed with 1/10 serial dilutions, in
44
45 elution buffer (10mM Tris-HCl, pH 8.5), of total DNA extracted from the Maracay strain from
46
47 1×10^5 - 1 parasite/mL. Molecular biology-grade water (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and ENC
48
49 were used as negative controls. The parasitic load of every sample was calculated using LightCycler
50
51 480 software by the second derivative maximum method.
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Reverse transcription-real time PCR assay (RT-qPCR): Five μL of RNA was submitted to reverse transcription before qPCR to obtain cDNA by the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche, Mannheim, Germany). Random hexamer primer 600pmol/ μL was used in the reaction in a final volume of 15 μL . The reaction was carried out in a thermocycler MJ Research, PTC-200 (Massachusetts, USA). The cDNA obtained was stored at -40°C . Five microliters of extracted cDNA was amplified by qPCR in a thermocycler (LightCycler 480, Roche, Mannheim, Germany) in triplicate. The primers D71 and D72 described by Souto et al.,¹⁴ were used and the protocol and conditions were briefly as follows: the final concentrations in the PCR mixture were SensiMix SYBR no- Rox kit 1X (Bioline reagents, United Kingdom), 750 nM of each *T. cruzi* primer in 20 μL reaction volume. The optimal cycling conditions were a first step of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min. A melting curve was done for 5 sec at 95°C , 65°C for 1 min and 97°C continuous. A sample was considered positive when the quantification cycle (Cq) was less than 35 and a melting temperature peak between $79\text{-}80^{\circ}\text{C}$. A standard curve was constructed with 1/10 serial dilutions, in water (RNase free) of total RNA extracted from the Maracay strain from 1×10^5 - 1 parasite/mL. The parasitic load of every sample was calculated using LightCycler 480 software by the second derivative maximum method. Molecular biology-grade water (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and an ENC were used as a negative control. Also, to control the digestion of DNA by DNase I, the RNA was studied by qPCR as described above.

RESULTS

The parasitic load of the infected WBU, the infected and leukoreduced WBU and the infected leukoreduced and riboflavin-UV-PRT-treated WBU was analyzed by qPCR; each value represents a mean of nine analyses and is expressed in parasites equivalents/mL of blood. The concentration of live and dead parasite DNA was similar in the infected WBU, and both decreased by more than 94% when a leukoreduction filter was applied. After application of the riboflavin-UV-PRT, the

1
2
3 concentration of both live and dead parasite DNA was reduced by more than 98%. These values
4
5 reflect the amount of DNA present in the samples and not necessarily the live parasites (Figure 1).
6
7 However, the cDNA quantification, measured by RT-qPCR, revealed that the concentration of
8
9 viable parasites was reduced by more than 99.3% after leukoreduction (41 parasites equivalent/mL
10
11 remained in the filtered blood) and by 100% after the riboflavin-UV-PRT procedure (0 parasite
12
13 equivalent/mL was detected). The quantification of cDNA of dead parasites allowed the technique
14
15 to be controlled, and no RT-qPCR signal was observed (Figure 2).
16
17

18 19 DISCUSSION

20
21 Several methods, including increasingly stringent donor selection criteria and donor screening, have
22
23 been implemented over the years to reduce pathogen transfusion-transmission risk. However,
24
25 asymptomatic yet infectious blood donors continue to challenge blood transfusion safety. *T. cruzi*,
26
27 the causal agent of Chagas disease, is a representative example of an emerging pathogen that is
28
29 gaining importance in non-endemic countries, where one of the major transmission routes is via
30
31 blood transfusion.³ Human migration is a potential factor for increased Chagas disease risk in non-
32
33 endemic areas, and the disease, no longer confined to Latin America, has become a global
34
35 problem.¹⁵ Strategies applied until now to prevent *T. cruzi* transfusion-transmission have certain
36
37 limitations: screening blood donors by risk factor questions for *T. cruzi* infection is vulnerable to
38
39 intentional or inadvertent misreporting, and selective donor screening does not capture all incident
40
41 cases (seroconversion) or new autochthonous cases.¹⁶ Hence the importance of studying other
42
43 strategies such as universal leukoreduction and PRT, which may complement existing screening
44
45 methods and therefore further minimize the possible risk of infections by blood transfusion.
46
47
48
49

50
51 Universal leukoreduction (ULR) refers to the process of removing white blood cells (WBC) from
52
53 all units of whole blood, red blood cells (RBC) or platelets prior to storage to a standardized degree
54
55 of purity, i.e. down to 5×10^6 per unit as required by the AABB,¹⁷ or 1×10^6 according to European
56
57 Union recommendations.¹⁸ Leukoreduction is recognized as useful for the prevention of three
58
59
60

1
2
3 complications arising from blood transfusion: febrile non-hemolytic transfusion-reactions, platelet
4 refractoriness due to human leukocyte antigen alloimmunization, and transmission of
5 cytomegalovirus. Patients at risk of these complications have traditionally been provided with
6 leukoreduced blood. Then in the late 1990s, accumulating evidence of transfusion-related
7 immunomodulation, a potential effect of the transfused leukocytes on the recipient's immune
8 system, and the suggestion that leukoreduction might decrease the transmission of a new variant of
9 Creutzfeldt-Jakob disease, led to the implementation of ULR in the United Kingdom, together with
10 other European countries and Canada, in 1999.¹⁹

11
12 In addition to the aforementioned advantages of leukoreduction, the removal of WBC can
13 contribute to the elimination of several intracellular pathogens, including certain viruses (i.e. CMV,
14 HHV-8, and HTLV-I/II), rickettsial species,^{20,21} trypanosomatids such as *Leishmania*²²⁻²⁴ and the
15 extracellular protozoan *T. cruzi*.²⁵ The removal of infected WBC is not the only mechanism
16 explaining the efficacy of leukoreduction filters in reducing the risk of protozoa transmission by
17 transfusion. It has been proven that both intracellular^{20-24,26} and extracellular²⁵ protozoan parasites
18 can be retained by leukoreduction filters via several mechanisms. In the case of *Leishmania*, its life
19 cycle involves two stages: an intracellular form or amastigote reproducing in macrophages, and an
20 extracellular form or promastigote, which is the initial form injected into the skin of the human host.
21 It has been described that the amastigote form contained within monocytes is removed as WBCs are
22 trapped within the filters, while free extracellular amastigotes and promastigotes are removed by
23 adhering directly to the filter fibers.²⁵ Other alternative mechanisms to explain parasite removal by
24 leukoreduction filters, has been proposed in other parasites, that include the adherence of
25 *Plasmodium falciparum*-infected RBCs to filters, platelets and to other RBCs.²⁶

26
27 In the case of *T. cruzi*, removal by blood leukoreduction has been described via direct adherence of
28 the trypomastigotes to filter fibers.²⁵ Indeed, in the present work we observed that the
29 leukoreduction filters retained up to 99% of the live parasites in the infected blood, which would
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 constitute an important reduction of the transmission risk of this extracellular parasite. Likewise,
4
5 Moraes-Souza et al.,²⁷ reported a reduction of 6 logs in *T. cruzi* concentration by means of
6
7 leukoreduction filtration in experimentally infected blood. However, despite this considerable
8
9 reduction, the infection was still transmitted to 30-50% of the animals infected with this filtered
10
11 blood. Similarly, our study has demonstrated that even though filtration can substantially reduce the
12
13 *T. cruzi* load in artificially spiked whole blood, it is not completely eliminated, because some of
14
15 these parasites remained in the filtered blood. The most common blood component involved in
16
17 Chagas disease blood transfusion-transmission is platelet concentrates, including leukoreduced
18
19 platelets from donors with serological evidence of Chagas infection.^{3,7} This is something to
20
21 consider, as the cases of transmission by transfusion reported in the literature involve chronic
22
23 chagasic patients with a low parasite load, usually lower than 1 parasite equivalent/mL in peripheral
24
25 blood.^{6,7}

26
27
28
29
30 Riboflavin-UV-PRT is based on the ability of riboflavin to easily cross lipid membranes of the
31
32 parasite and nonspecifically interacts with nucleic acids. Upon UV (265- 370 nm) light exposure,
33
34 the riboflavin modifies the pathogen nucleic acids through the oxidation of guanine residues and
35
36 production of reactive oxygen species to an extent that pathogens in blood can no longer replicate.
37
38 This method benefits from the lack of DNA in RBCs and platelets, (components that are beneficial
39
40 in transfusion) and its presence in parasites and other microorganisms.²⁸ Various studies, both *in*
41
42 *vivo* and *in vitro*, have investigated the effectiveness of treating whole blood with riboflavin-UV
43
44 light PRT to reduce infectivity of several intracellular parasites, such as *Babesia microti*,^{12,29}
45
46 *Plasmodium*,³⁰ and *Leishmania*,³¹ and extracellular parasites such as *T. cruzi*.^{10,11}

47
48
49
50 Although leukoreduction filtration²⁵ or riboflavin and UV light treatment^{10,11} have been studied
51
52 separately for their efficacy in reducing the *T. cruzi* load in whole blood, to our knowledge, the
53
54 combined effect of both methods on the transfusion-transmission risk of *T. cruzi* has not been
55
56 investigated until now.
57
58
59
60

1
2
3 Parasite viability methods such as hemocultures have been used to prove the effectiveness of the
4
5 infectious parasite by reduction methods like leukoreduction²¹ and riboflavin-UV-PRT.²⁴ However,
6
7 the well-known drawbacks associated with hemoculture, which is time-consuming and gives results
8
9 with low sensitivity,^{32,33} raises the question of what results might look like when applying more
10
11 sensitive and efficient assays for parasite detection such as PCR. Nevertheless, although PCR can
12
13 detect and quantify parasitic DNA, it cannot differentiate between live and dead parasites, as shown
14
15 in Figure 1. This limitation can be resolved by the quantification of 24S α ribosomal RNA specific
16
17 to *T. cruzi* by RT-qPCR, which effectively detects and quantifies RNA of live parasites. The
18
19 viability of parasites other than *T. cruzi* (*Leishmania spp.*,³⁴ *Giardia Lamblia*³⁵ and *Plasmodium*
20
21 *vivax*³⁶) has been evaluated using the RT-qPCR technique. The current study is the first to
22
23 demonstrate the efficiency of combining filtration and riboflavin-UV-PRT treatment to reduce the
24
25 *T. cruzi* load in whole blood using RT-qPCR as a parasite viability method.
26
27
28
29

30
31 Interestingly, despite the large number of organisms with which the WBUs were infected, we
32
33 observed a complete elimination of the *T. cruzi* load by the combined use of leukoreduction
34
35 filtration and riboflavin-UV-PRT. A far greater parasite load was used than would be expected in a
36
37 unit collected from a donor in the asymptomatic chronic phase of Chagas disease, which is
38
39 characterized by an intermittent circulation and low burden of *T. cruzi*.^{6,7} However, parasite loads of
40
41 newly infected children range from 0.01 to 640 parasites /mL,⁵ values that could be similar to those
42
43 in newly infected adults. This very high amount of parasite may not be completely eliminated by
44
45 filtration but it could certainly be eliminated by subsequent riboflavin-UV-PRT treatment.
46
47
48

49 In conclusion, although the currently implemented donor screening measures such as assessment of
50
51 donor risk through questionnaires and selective testing may significantly lower the incidence of
52
53 transfusion-transmission of *T. cruzi*, the risk of donating blood products with infectious parasites
54
55 remains. While leukoreduction by filtration lessens the risk, without eliminating it, the riboflavin-
56
57 UV-PRT treatment entirely eradicates the parasites remaining in the filtered whole blood units, as
58
59
60

1
2
3 has been proven *in vitro* by the present study and the cases of *T. cruzi* transmission by leukoreduced
4
5 blood component transfusion.³ In addition, although such cases are rare, the selective serological
6
7 testing approach presently in use in some endemic and non-endemic countries will fail to detect
8
9 newly infected donors with high parasitemia levels insufficiently removed by leukoreduction filters.
10
11 The data presented here show that riboflavin-UV-PRT in conjunction with leukoreduction filtration
12
13 can eliminate significant amounts of *T. cruzi* from whole blood, and could complement other blood
14
15 bank measures already implemented to prevent the risk of Chagas disease transfusion-transmission.
16
17 Additionally, this approach would avoid the need for multiple individual screening tests for other
18
19 agents such as malaria³⁰ and *Leishmania*³¹, also prevalent in Chagas endemic areas.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the donors for participating in the study. The authors also wish to thank Lucy Brzoska for his invaluable advice on the preparation of the manuscript.

AUTHORSHIP CONTRIBUTIONS

Contribution: All authors contributed to experimental design and edited the manuscript. T.J-M. and B.C-F. wrote the manuscript.

For Review Only

REFERENCES

1. Pan American health Organization. World Health Organization. Regional Office for the Americas. General Information- Chagas Disease. Available from: <http://www.paho.org/hq/index.php>.
2. Bern C. Chagas's Disease. *N Engl J Med*. 2015; 373(59): 456-466.
3. Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby DA, et al. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: Evidence in support of transfusion transmission (CME). *Transfusion*. 2012; 52(9):1913–1921.
4. Centers For Disease Control and Prevention . Chagas disease after organ transplantation - United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2006;55:798-800.
5. Soriano-Arandes A, Angheben A, Serre-Delcor N, et al. Control and management of congenital Chagas disease in Europe and other non-endemic countries: Current policies and practices. *Trop Med Int Health*. 2016; 21(5):590-596
6. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, et al. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:e419.
7. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, et al. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion*. 2015;55:1249-1255.
8. Weinman D, MacAlister J. Prolonged storage of human phatogenic protozoa with conservation of virulence. *Am J Hyg*. 1947;45:102-21.
9. Filardi LS, Brener Z. Cryopreservation of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *J Protozool*. 1975;22: 398-401.
10. Cardo LJ, Salata J, Mendez J, et al. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelets concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci*. 2007;37:131-37.

- 1
2
3 11. Laura Tonnetti, Aaron M Thorp, Heather L Reddy, et al. Goodrich, and David A. Leiby.
4 Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and ultraviolet light for
5 whole blood. *Transfusion*. 2012;52:409-416.
6
7
- 8
9 12. Reddy HL, Doane SK, Keil SD, et al. Development of a riboflavin and ultraviolet light-
10 based device to treat whole blood. *Transfusion*. 2013;53(1):131S-136S.
11
12
- 13 13. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, et al. Development of a real-time PCR assay for
14 *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta tropica*. 2007; 103(3):195–200.
15
16
- 17 14. Souto R, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by
18 amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62(1):45-52.
19
20
- 21 15. Connors EE, Vinetz JM, Weeks JR, et al. A global systematic review of Chagas disease
22 prevalence among migrants. *Acta Trop*. 2016;156:68-78.
23
24
- 25 16. Agapova M, Busch MP, Custer B. Cost-effectiveness of screening the US blood supply for
26 *Trypanosoma cruzi*. *Transfusion*. 2010;50:2220-2232
27
28
- 29 17. Wilkinson SL, Lipton KS. Leukocyte reduction. Association Bulletin #99-7, Bethesda, MD:
30 American Association of Blood Banks, 1999.
31
32
- 33 18. Council of Europe E. Guide to the Preparation, use and quality assurance of blood
34 components. 18th ed. Strasbourg; 2015.
35
36
- 37 19. Gilliss BM, Looney MR, Gropper MA. Reducing non-infectious risks of blood transfusion.
38 *Anesthesiology*. 2011;115(3):635-649.
39
40
- 41 20. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to
42 diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715-2727.
43
44
- 45 21. Mettillie FC, Salata KF, Belanger KJ, et al. Reducing the risk of transfusion-transmitted
46 rickettsial disease by WBC filtration, using *Orientia tsutsugamushi* in a model
47 system. *Transfusion*. 2000;40:290-296.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 22. Kyriakou D, Alexandrakis M, Passam F, et al. Quick detection of *Leishmania* in peripheral
4 blood by flow cytometry. Is prestorage leucodepletion necessary for leishmaniasis prevention in
5 endemic areas?. *Transfus Med.* 2003;13:59-62.
6
7
8
9
10 23. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, et al. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum*
11 in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* 2008;48:1383-1389.
12
13
14 24. Cardo LJ, Salata J, Harman R, et al. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood
15 products when used at collection or at the bedside. *Transfusion.* 2006;46:896-902.
16
17
18 25. Cardo LJ, Asher L. Electron micrographic study of the removal of *Trypanosoma cruzi* from
19 blood products by leukodepletion filters. *Transfusion.* 2006;46:1067-1068.
20
21
22
23 26. Cardo LJ, Salata J, Wilder D. Removal of *Plasmodium falciparum* - infected red blood cells
24 from whole blood by leukoreduction filters. *Transfusion.* 2009; 49. 337-346.
25
26
27 27. Moraes-Souza H, Bordin JO, Bardossy L, et al. Prevention of transfusion-associated
28 Chagas' disease: efficacy of white cell reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from
29 infected blood. *Transfusion.* 1995;35:723-6.
30
31
32
33
34 28. Mundt JM, Rouse L, Van den Bossche J, et al. Chemical and Biological Mechanisms of
35 Pathogen Reduction Technologies. *Photochem Photobiol* 2014;90(5):957-964.
36
37
38
39 29. Tonnetti L, Thorp AM, Reddy HL, et al. Riboflavin and ultraviolet light reduce the
40 infectivity of *Babesia microti* in whole blood. *Transfusion.* 2013 ;53(4):860-867
41
42
43
44 30. Owusu-Ofori S, Kusi J, Owusu-Ofori A, et al. Treatment of Whole Blood With Riboflavin
45 and UV Light: Impact on Malaria Parasite Viability and Whole Blood Storage. *Shock.* 2015;44
46 (1):33-38.
47
48
49
50 31. Tonnetti L, Thorp AM, Reddy HL, et al. Reduction of *Leishmania donovani* infectivity in
51 whole blood using riboflavin and ultraviolet light. *Transfusion.* 2015;55(2):326-329.
52
53
54
55 32. Chiari E, Dias JC, Lana M, et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human
56 chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989; 22: 19-23.
57
58
59
60

1
2
3 33. Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. Mem Inst
4
5 Oswaldo Cruz. 1999; 94 (1):295–298.

6
7 34. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, et al. Development of a reverse transcriptase loop-
8
9 mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of Leishmania
10
11 parasites in clinical samples. Am J Trop Med Hyg. 2010;82(4):591–6.

12
13 35. Baque RH, Gilliam AO, Robles LD, et al. A real-time RT-PCR method to detect viable
14
15 Giardia lamblia cysts in environmental waters. Water Res. 2011;45(10):3175–84.

16
17 36. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, et al. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity
18
19 in sub-microscopic infections. Malar J. 2016;15(1):48.
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **THE EFFECTIVENESS OF RIBOFLAVIN AND UV LIGHT PATHOGEN**
4 **REDUCTION TECHNOLOGY IN ELIMINATING *TRYPANOSOMA CRUZI***
5 **FROM LEUKOREduced WHOLE BLOOD.**
6
7
8
9

10
11 **FIGURES**
12

13
14
15 Figure 1. Quantification of *T. cruzi* DNA (logarithmic values of parasite equivalents/mL) in the
16 different WB samples before and after the application of leukoreduction by filtration and the
17 riboflavin pathogen reduction system (riboflavin UV-PRT) procedures were applied.
18
19
20
21
22
23

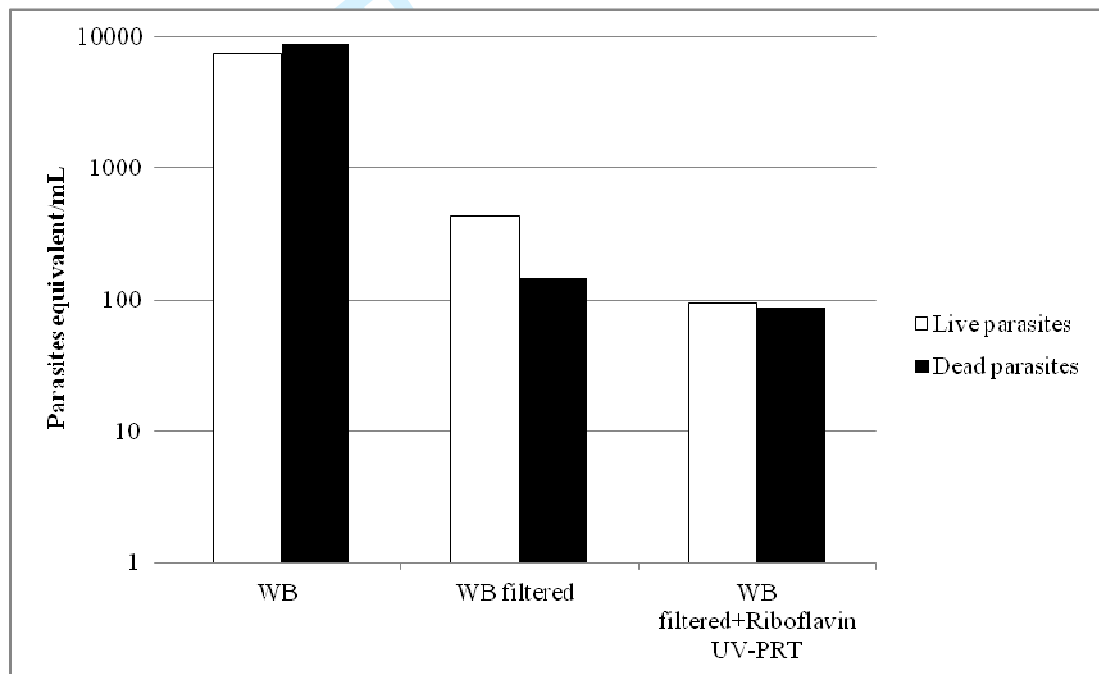
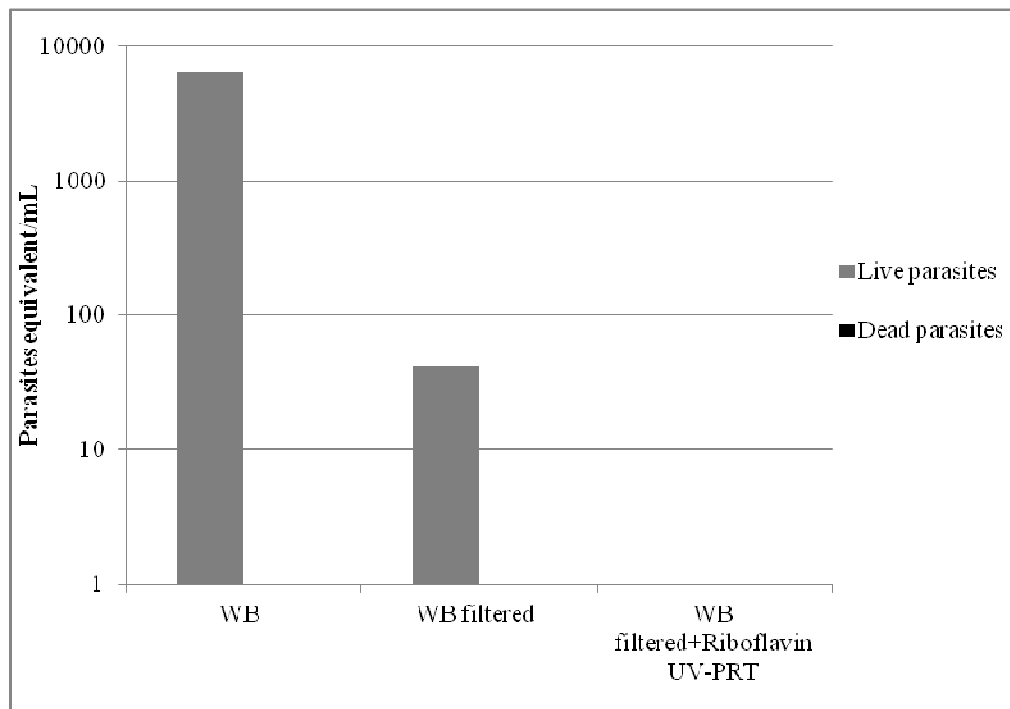


Figure 2. Quantification of *T. cruzi* cDNA (logarithmic values of parasite equivalents/mL) in the different WB samples before and after leukoreduction by filtration and riboflavin pathogen reduction (riboflavin UV-PRT) procedures were applied.



3.5. ARTÍCULO 5

“Detection and quantification of viable and nonviable
Trypanosoma cruzi parasites by a propidium monoazide real-time
polymerase chain reaction assay”

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE *TRYPANOSOMA CRUZI* VIABLES Y NO VIABLES MEDIANTE UN ENSAYO DE PROPIDIO MONOAZIDA-REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL

Beatriz Cancino-Faure, Roser Fisa, M. Magdalena Alcover, Teresa Jimenez-Marco, Cristina Riera

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

2016, 94 (6):1282–1289

doi: 10.4269/ajtmh.15-0693

Factor de impacto: 2,699

RESUMEN

Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), permiten la detección y cuantificación de DNA pero no son capaces de distinguir entre señales provenientes de células viables o no viables. El objetivo de este estudio fue optimizar y evaluar un ensayo basado en el uso conjunto de un colorante vital, el propidio monoazida (PMA) y una qPCR específica para *Trypanosoma cruzi* que permitiera diferenciar entre parásitos viables y no viables. El PMA tiene la capacidad de penetrar la membrana plasmática de las células muertas y unirse covalentemente al DNA durante la exposición a luz visible, inhibiendo la amplificación de la PCR. Se ensayaron diferentes concentraciones de PMA (50–200 μM) y de epimastigotes tanto viables como no viables de *T. cruzi* de la cepa Maracay (1×10^5 – 10 parásitos/mL). Se pudo observar en el ensayo de PMA-qPCR, optimizado a 100 μM , una reducción significativa al comparar epimastigotes viables *versus* no viables tratados con PMA, con una media de reducción de la señal de 2,5 unidades de \log_{10} y un porcentaje de reducción $> 98\%$, en todas las concentraciones de parásitos ensayadas. Se observó además, una reducción significativa de la señal cuando se aplicó el ensayo de PMA-qPCR a una mezcla de parásitos vivos/muertos, la que permitió la detección de las células vivas, excepto cuando la concentración de parásitos vivos fue baja (10 parásitos/mL) en relación a la de muertos (1×10^5 parásitos/mL). El ensayo de PMA-qPCR desarrollado permite la diferenciación entre epimastigotes de *T. cruzi* viables y no viables y por lo tanto podría ser utilizado como método de detección de viabilidad y cuantificación para este parásito.

Detection and Quantification of Viable and Nonviable *Trypanosoma cruzi* Parasites by a Propidium Monoazide Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay

Beatriz Cancino-Faure, Roser Fisa,* M. Magdalena Alcover, Teresa Jimenez-Marco, and Cristina Riera

Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain; Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Mallorca, Balearic Islands, Spain; IUNICS Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Spain

Abstract. Molecular techniques based on real-time polymerase chain reaction (qPCR) allow the detection and quantification of DNA but are unable to distinguish between signals from dead or live cells. Because of the lack of simple techniques to differentiate between viable and nonviable cells, the aim of this study was to optimize and evaluate a straightforward test based on propidium monoazide (PMA) dye action combined with a qPCR assay (PMA-qPCR) for the selective quantification of viable/nonviable epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. PMA has the ability to penetrate the plasma membrane of dead cells and covalently cross-link to the DNA during exposure to bright visible light, thereby inhibiting PCR amplification. Different concentrations of PMA (50–200 μM) and epimastigotes of the Maracay strain of *T. cruzi* (1×10^5 – 10 parasites/mL) were assayed; viable and nonviable parasites were tested and quantified by qPCR with a TaqMan probe specific for *T. cruzi*. In the PMA-qPCR assay optimized at 100 μM PMA, a significant qPCR signal reduction was observed in the nonviable versus viable epimastigotes treated with PMA, with a mean signal reduction of 2.5 logarithm units and a percentage of signal reduction > 98%, in all concentrations of parasites assayed. This signal reduction was also observed when PMA-qPCR was applied to a mixture of live/dead parasites, which allowed the detection of live cells, except when the concentration of live parasites was low (10 parasites/mL). The PMA-qPCR developed allows differentiation between viable and nonviable epimastigotes of *T. cruzi* and could thus be a potential method of parasite viability assessment and quantification.

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a parasitic protozoan that causes Chagas disease in human beings and other mammals, and is transmitted by triatomine vectors in endemic zones, as well as by nonvector routes, including vertically from mother to newborn, organ transplantation, blood transfusion, and other less common ways such as laboratory accidents. This systemic chronic illness represents the third highest parasitic disease burden after malaria and schistosomiasis, and is a serious public health issue in 21 endemic Latin American countries, with an estimated 8 million people already infected and about 50,000 new cases per year.^{1–3} With increasing globalization, Chagas disease is also becoming a health threat worldwide. Cases arising from blood transfusion, organ transplantation, and vertical transmission are being increasingly detected in non-endemic areas, including the United States, Canada, several European countries, and Oceania, as a consequence of large-scale migration of infected individuals from Latin America.^{4–8} Moreover, oral infection of Chagas disease is currently considered as an important transmission pathway in endemic areas, even though where vectorial transmission has been successfully interrupted,⁹ with high mortality rates.⁴ In the Brazilian Amazon region, several outbreaks of Chagas disease have been described due to oral transmission, involving more than 1,500 patients.¹⁰ Chagas disease could therefore be classified as a foodborne infection, principally associated with the consumption of infected food such as wild animal meat, homemade juices, and artisan beverages contaminated with the parasite-infected vector.^{9,11,12}

In an effort to achieve a more sensitive detection of *T. cruzi* than provided by conventional parasitological tech-

niques, in the last 20 years, PCR technology has been applied to identify *T. cruzi* DNA in blood samples or biopsies from Chagasic patients,^{13,14} which has opened new possibilities in diagnosis and follow-up assessment of chemotherapy.^{15–17} PCR has also proved useful for *T. cruzi* detection in vector and reservoir studies.^{18,19} However, a drawback of the PCR technique is that it cannot distinguish between DNA signals from live or dead parasites and consequently a positive result does not imply pathogen viability. Methods to evaluate *T. cruzi* viability based on RNA detection are not routinely used due to their high handling complexity. Likewise, axenic culture presents low sensitivity and takes a long time to provide conclusive results.^{20,21} Saavedra and others have developed a hybrid PCR and xenodiagnosis (XD) methodology to evaluate parasite viability in chronic Chagasic patients and improve the sensitivity of diagnosis by XD, but as stated before, the classic techniques are time consuming, and require trained personal and special laboratory conditions, among other drawbacks.²²

Recently developed photochemical dyes can be applied in combination with PCR to detect viable cells, based on cell membrane integrity. Ethidium monoazide (EMA) and propidium monoazide (PMA) have the capacity to bind to free DNA/RNA, but not protected nucleic acid, as they are cell membrane impermeable. In the case of damaged or dead cells, the dyes can pass through the membrane and covalently cross-link to organic molecules, including DNA, under exposure to bright visible light.^{23,24} This covalent binding prevents subsequent amplification of DNA by PCR, thereby indicating cell nonviability. The efficiency of these techniques depends on a variety of factors, including the type and concentration of the dye, the light source, incubation conditions, and the microorganism, all of which need to be considered during optimization.²⁵

EMA-PCR and PMA-PCR assays have been applied to a wide variety of microorganisms, including bacterial vegetative cells, bacterial spores, fungi, viruses, and yeast,

*Address correspondence to Roser Fisa, Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n. E-08028, Barcelona, Spain. E-mail: rfisa@ub.edu

principally in the fields of environment and food.^{26–31} Lately, they have also been applied in bacterial studies on clinical samples, indicating that this method constitutes a potential alternative to diagnosis by microscopy and culture, as well as in monitoring early treatment response^{32,33} or in drug experimental assays.^{34,35} However, to date, this methodology has had only scant application in parasites, for example, oocysts of *Cryptosporidium*, cysts of *Giardia duodenalis*, trophozoites, and cysts of *Acanthamoeba castellanii* in clinical and environmental samples.^{29,31,36,37} The aim of this study was to evaluate if PMA-qPCR assay can differentiate between live and dead epimastigotes of *T. cruzi* and thus have potential application in parasite viability assessment and quantification.

MATERIALS AND METHODS

Epimastigotes of *T. cruzi* and inactivation treatment.

Epimastigotes of *T. cruzi* (Maracay strain) were grown in liver infusion tryptose medium (LIT) at 28°C until the logarithmic growth phase. Twenty milliliters of the culture was centrifuged at $1,800 \times g$ for 10 minutes; the pellet was suspended in the same medium and viable parasites were counted in a Rosenthal hemocytometer chamber with trypan blue dye. The stock was serially diluted 10-fold from 1×10^5 to 10 parasites/mL with LIT. Each dilution was equally divided to make two sets of parasite suspension. One set of parasites was used for live parasite studies and the other set was subjected to inactivation by exposure to isopropanol (final concentration of 70%) for 10 minutes. Isopropanol was removed by harvesting epimastigotes using centrifugation at $10,000 \times g$ for 5 minutes before resuspension in LIT. These assays were performed in duplicate. As a control, an aliquot of each set of parasites was cultured to ensure the viability or nonviability of the parasites in LIT for 2 weeks.

PMA treatment. PMA (GenIUL, Barcelona, Spain) was dissolved in water of molecular biology grade (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) to obtain a stock solution of 2,000 μM , which was stored at 4°C in darkness for no longer than 2 months. All subsequent steps using PMA were performed under minimal light conditions. PMA stock solution was added at a final concentration of 50, 100, and 200 μM to a total volume of 300 μL of 1×10^5 , 1×10^4 , and 1×10^3 parasites/mL, both live and dead, to determine the optimal final PMA concentration. The resulting suspension was incubated for 30 minutes at room temperature in darkness, mixing every 10 minutes. Live and dead parasites not treated with PMA were used as a control. All the samples (treated and not treated with PMA) were then photoactivated for 15 minutes in constant mode using a light-emitting diode (LED) source that emits light in the blue range of the visible spectra (464–467 nm, 60 W; Phast Blue PhotoActivation System; GenIUL, Barcelona, Spain). The assay was performed in duplicate.

DNA extraction. Immediately after the photoactivation, the samples were pelleted by centrifugation at $13,000 \times g$ for 5 minutes, and the remaining supernatant was discarded to achieve a final volume of 200 μL . DNA extraction was done with the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Mannheim, Germany) and eluted in 200 μL of elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5) according to the manufacturer's instructions. The concentration of eluted DNA was measured

in a NanoDrop (ND-1000, ThermoScientific, Wilmington, DE) and stored at -20°C for qPCR analysis. For the extraction negative control (ENC), LIT was used without a template.

Real time PCR (qPCR) assay. Five microliters of extracted DNA was amplified by qPCR in a thermocycler (LightCycler 480, Roche) in duplicate. The primers, probes, and conditions of the technique were as described by Piron and others¹⁷ with some modifications. Briefly, the following were used: Cruzi 1 and Cruzi 2 primers, and a Cruzi 3 probe, which was labeled with 6-carboxyfluorescein and a minor groove binder. The final concentrations in the PCR mixture were as follows: $1 \times$ LightCycler 480 Probes Master (Roche), 750 nM of each *T. cruzi* primer and 250 nM of the *T. cruzi* probe in 20 μL reaction volume. The amplification was run in 45 cycles and the annealing temperature was 58°C.

A standard curve was constructed with 1/10 serial dilutions, in elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.5), of total DNA extracted from the Maracay strain from 1×10^5 to 1 parasites/mL. Molecular biology-grade water (Sigma-Aldrich) and ENC were used as negative controls.

The parasitic load of every sample was calculated using LightCycler 480 software by the second derivative maximum method. The limit of detection (LOD) of the technique was calculated in 2 parasite equivalents/mL.¹⁷

Statistical analysis. The data were analyzed with IBM SPSS Statistics. Comparisons were carried out with a one-way analysis of variance and post hoc Tukey's honestly significant difference. Differences with *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

qPCR on *T. cruzi* epimastigotes. The qPCR standard curve showed a linearity of 0.9881 between the log concentrations of epimastigotes and the Cq value, with a dynamic range from 1×10^5 to 10 parasites/mL and an efficiency of 90% (Figure 1). Before the PMA treatment, the serial 10-fold diluted stock from 1×10^5 to 10 parasites/mL of live and dead *T. cruzi* epimastigotes were measured by qPCR in Cq values, and expressed in parasite equivalents/mL (Figure 2). Values for live and dead parasites were quite similar at all concentrations, indicating that minimal quantities of DNA were lost in the washing steps of the procedure. All the control cultures of the epimastigotes were positive, except 10 parasites/mL and those treated with isopropanol.

PMA-qPCR optimization on *T. cruzi* epimastigotes. The optimum concentration of PMA that provided the greatest difference in qPCR values between treated viable and nonviable parasites was expressed in ΔCq values (Cq PMA-treated dead parasites – Cq PMA-treated live parasites). Three concentrations of parasites/mL (1×10^3 – 1×10^5) and three concentrations of PMA (50, 100, and 200 μM) were assayed. The best differentiation between live and dead cells was achieved by 100 μM in all the parasite concentrations assayed, and increasing the PMA concentration did not improve the results (Figure 3).

Treated and nontreated with 100 μM PMA concentrations of live *T. cruzi* epimastigotes (1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10 parasites/mL) were studied by qPCR and no significant signal reduction in PMA-treated versus nontreated

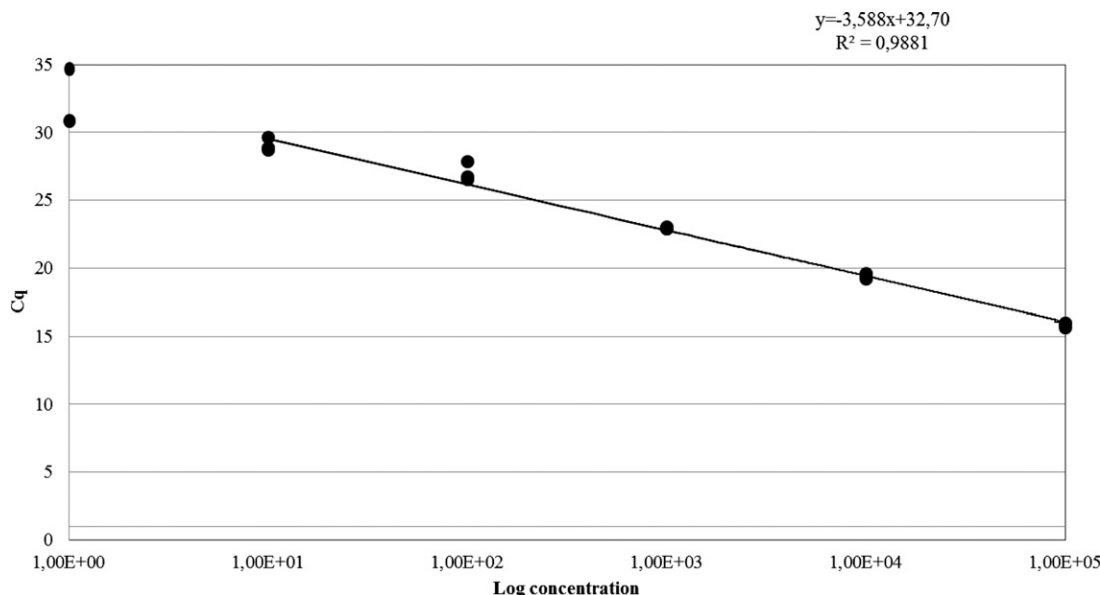


FIGURE 1. Standard curve constructed by plotting the mean Cq values, studied in triplicate, with respect to the logarithm10 of the *Trypanosoma cruzi* DNA concentrations (10-fold serial dilutions 1×10^5 –1 parasite/mL).

living cells ($P > 0.05$) was observed, indicating no significant effect of PMA on live *T. cruzi* epimastigotes.

To assess the PMA impact on the reduction of the qPCR signal of dead versus live parasites, the same concentrations of dead and live *T. cruzi* epimastigotes were tested (Table 1). A higher shift was observed for 1×10^5 – 1×10^3 parasites/mL with a ΔCq between 9 and 7.5, which is equivalent to a fall of 2.5–3.2 log units between the viable and nonviable parasites; for 1×10^2 and 10 parasites/mL, a ΔCq of around 2.7–3.7 was detected, which is equivalent to a fall of 1.8 log units. A significant ($P < 0.002$) PMA-qPCR signal reduction was observed for all parasite concentrations studied, except for 10 parasites/mL. The percentage of signal reduction was between 98.4% and 99.9% for all concentrations studied. Despite the high level of reduction, a number of parasites were still detected. The concentration of dead parasites dropped below 1 parasite equivalent/mL in concentrations $\leq 10^3$

parasites/mL, but at higher parasite concentrations, the reduction exceeded the LOD of the technique (Figure 4).

Quantification of live *T. cruzi* from live/dead parasite mixtures. To observe the effect of a mixture of live and dead epimastigotes on the qPCR-PMA, a set of 10-fold dilutions of live parasites ranging from 1×10^5 to 10 parasites/mL was mixed with a concentration of 1×10^5 dead parasites. This assay was performed in duplicate, treated and nontreated with PMA. The qPCR results indicated that the concentrations expressed in parasites equivalent/mL were similar for all parasite concentrations when untreated (Figure 5). These results reflect the maximum concentration of dead parasites in a sample (1×10^5 parasites/mL), and fail to reflect the real number of live parasites in the mixture. In contrast, the qPCR values of the PMA-treated mixture indicate a linear relationship between Cq and the number of viable cells, which was only affected when the concentration of live cells

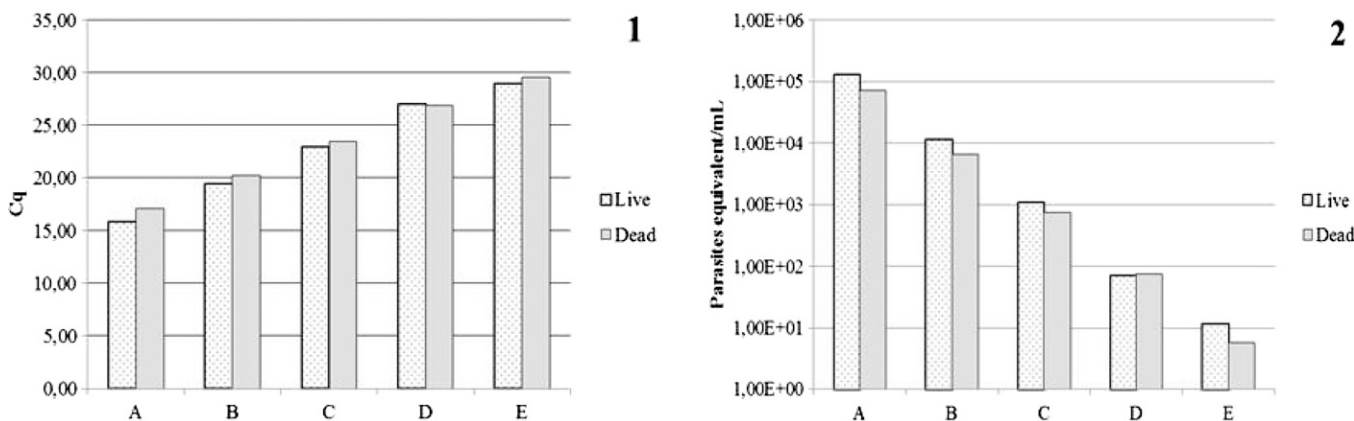


FIGURE 2. Results by real time polymerase chain reaction of different concentrations of live and dead parasites before propidium monoazide treatment (A = 1×10^5 ; B = 1×10^4 ; C = 1×10^3 ; D = 1×10^2 ; E = 10 parasites/mL). (A) Results expressed in Cq values. (B) Results quantified in parasite equivalents/mL.

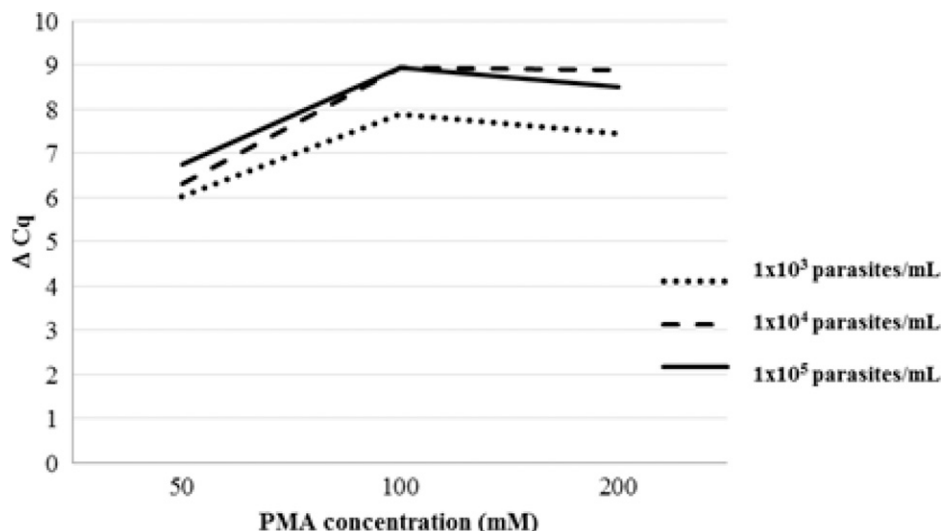


FIGURE 3. Propidium monoazide (PMA) real-time polymerase chain reaction optimization results, expressed in ΔCq obtained at different PMA concentrations (50, 100, and 200 μM) when different parasite concentrations were tested (1 × 10³–1 × 10⁵ parasites/mL).

was low, demonstrating that the concentration results basically reflect the amount of live parasite DNA in the mixture.

DISCUSSION

Although molecular methods such as PCR can help to detect and quantify parasites with high sensitivity and specificity, PCR by itself is unable to differentiate between live and dead parasites, which can undermine the value of the results. Recently, qPCR has been tested in combination with PMA in a variety of microorganisms, principally those affecting the food industry and more recently in clinical pathogens, to assess treatment effectiveness. In this study, we assessed the performance of PMA treatment in minimizing detection signals by qPCR from nonviable epimastigotes of *T. cruzi* and propose it as a potential tool for viability quantification.

The photochemical dye PMA at 100 μM significantly reduced the qPCR signal from nonviable epimastigotes, effectively separating them from viable parasites. The PMA treatment appeared to have no toxic effect on the epimastigotes, since no significant differences in concentration were observed between live PMA-treated and nontreated parasites. This suggests that PMA does not penetrate the membrane of living *T. cruzi* epimastigotes at the tested levels. Similar PMA concentrations have been used without significant cytotoxic

effects on protozoa such as *Cryptosporidium* spp. oocysts³⁶ and *Mycobacterium tuberculosis* bacteria.³⁸

A considerable signal reduction in dead *T. cruzi* epimastigotes was achieved by PMA-qPCR, with a decrease in detection of > 98% at all parasite concentrations studied. Nevertheless, at high parasite concentrations (1 × 10⁵–1 × 10⁴ parasites/mL), despite the very high signal reduction (a maximum of 99%), a remaining qPCR signal in the dead PMA-treated parasites generated a false positive. These results are consistent with other studies, where PMA was unable to completely eliminate the qPCR signal of dead *Salmonella* serovar Enteritidis, *Mycobacterium avium*, and *Listeria innocua*.^{39–41} In contrast, in *Acanthamoeba* spp. (1 × 10⁶ cysts and trophozoites killed by autoclave), the PMA-qPCR signal was successfully reduced to zero by enhancing the PMA concentration to 200 μM, after 100 μM proved ineffective in differentiating between viable and nonviable parasites.²⁹ In our study, increasing the PMA concentration did not further reduce the qPCR signal of dead epimastigotes of *T. cruzi*. Similarly, Barbau-Piednoir and others (2014) found that, Cq values for all tested dilutions of dead bacteria did not differ between 75 and 150 μM of PMA.

To reduce or avoid both false-negative and false-positive qPCR signals,²⁵ a variety of factors should be taken into account when optimizing the technique, such as the type and concentration of dye, the light source, the type of

TABLE 1

qPCR results of different concentrations of viable and nonviable epimastigotes, treated with 100 μM PMA. Comparison of Cq values, parasite concentration, and percentage of PMA-qPCR signal reduction

Parasites/mL*	Mean Cq values			Mean parasite concentration†				P value
	Dead parasites	Live parasites	ΔCq	Dead parasites	Live parasites	Δ Concentration‡	Signal reduction‡	
1.00E + 05	24.79	15.82	9.0	3.023E + 02	1.021E + 05	1.018E + 05	99.7	0.001
1.00E + 04	28.12	19.46	8.7	1.165E + 01	9.815E + 03	9.803E + 03	99.8	0.000
1.00E + 03	30.55	23.09	7.5	5.600E - 01	9.575E + 02	9.569E + 02	99.9	0.000
1.00E + 02	30.21	26.48	3.7	8.500E - 01	5.927E + 01	5.842E + 01	98.5	0.002
1.00E + 01	31.76	29.04	2.7	9.000E - 02	5.890E + 00	5.800E + 00	98.4	0.241

PMA = propidium monoazide; qPCR = real-time polymerase chain reaction.

*Concentration of viable and nonviable epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*.

†qPCR results expressed in parasite equivalents/mL.

‡Expressed in percentage.

§Δ Concentration calculated as live parasites - dead parasites.

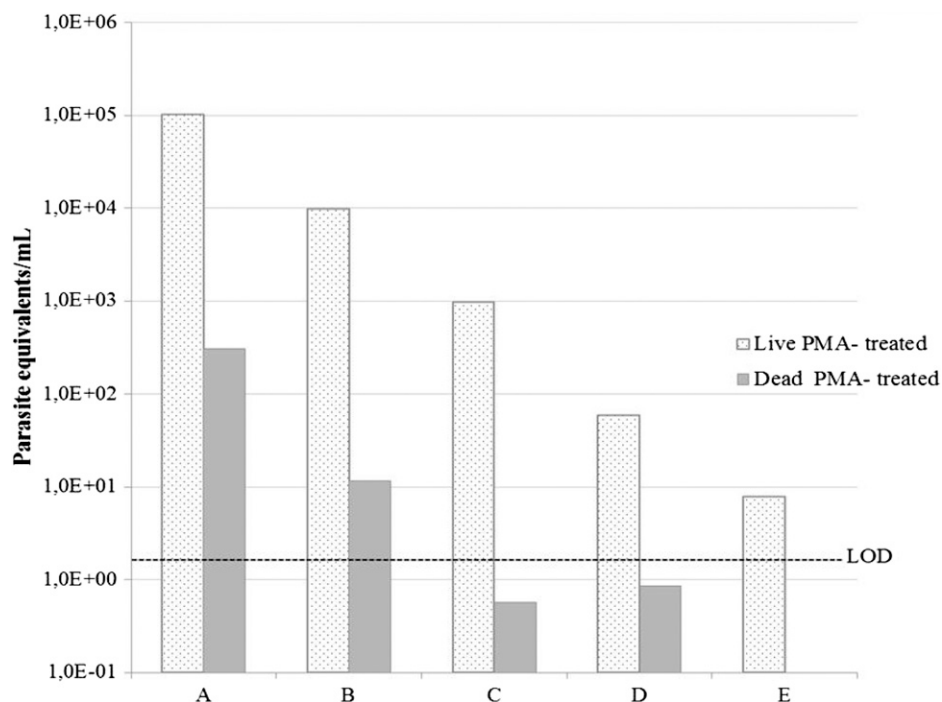


FIGURE 4. Propidium monoazide (PMA) real-time polymerase chain reaction results expressed in parasite equivalents/mL of different concentrations of live and dead parasites, both treated with PMA. Epimastigotes were studied at A = 1×10^5 ; B = 1×10^4 ; C = 1×10^3 ; D = 1×10^2 ; E = 10 parasites/mL. Limit of detection (LOD) = 2 parasite equivalents/mL.

microorganism, or the amplicon length. Of the two types of dye used in this field, PMA is described as more effective in differentiating between live and dead cells, whereas EMA is slightly more efficient in signal suppression, although with the disadvantage that it can penetrate the living cells of some microorganisms.^{24,42} The light source, as mentioned above, is another factor in the generation of false positives. In particu-

lar, studies using halogen lamps without an emission wavelength specific for PMA show fluctuating efficiency, due to variable light activation and the intense heat emitted. To minimize this variability, we used a commercial LED-based system designed especially for the exposure of cell suspensions to light, with the advantage that LEDs emit light in the blue range of visible spectra, allowing for optimal dye

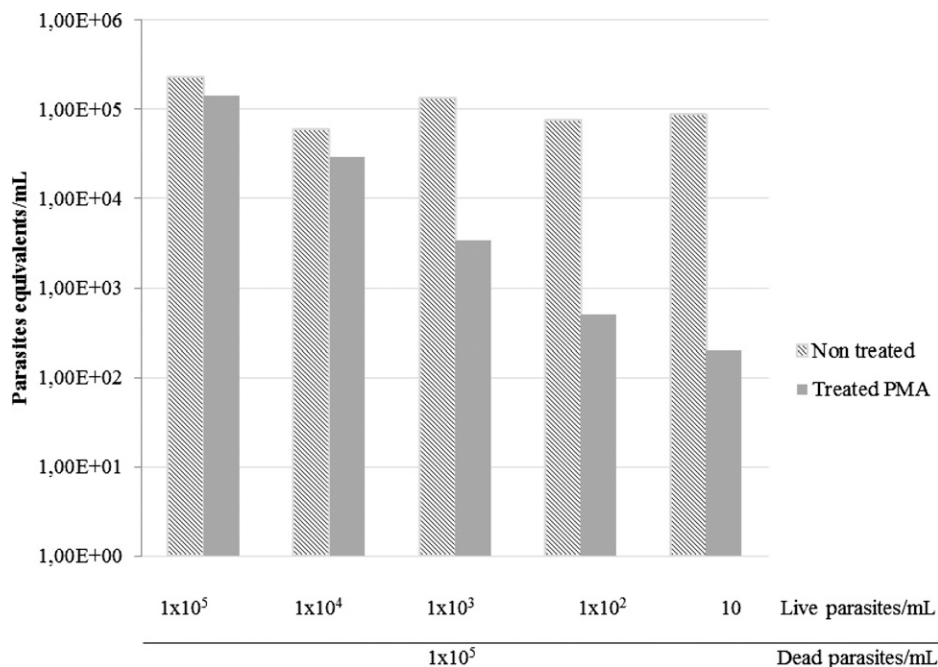


FIGURE 5. Quantification in parasites equivalent/mL of *Trypanosoma cruzi* from mixture of live (1×10^5 –10 parasites/mL) and dead (1×10^5 parasites/mL) parasites, treated and nontreated with 100 μ M propidium monoazide.

activation without heat generation. Therefore, this factor was ruled out as the cause of the persistent qPCR signal.

Some authors suggest the technique can be further improved by studying the effect of PCR amplicon length, an important experimental parameter when analyzing samples treated with viability dyes.⁴³ Alonso and others (2014) reported a more effective exclusion of dead cysts of *Giardia duodenalis* in a qPCR assay with longer amplicons. Likewise, Li and Chen (2013) found a good correlation between amplicon length and the signal inhibitory effect of PMA treatment on dead cells of *Salmonella* spp, concluding that the best qPCR signal reduction was obtained with the larger amplicon, albeit with a slight loss of technique efficiency. As suggested by Soejima and others (2011)⁴⁴ and Contreras and other (2011),⁴⁵ the beneficial effect of targeting longer DNA sequences is likely due to the increased probability of dye binding in the targeted region, resulting in a stronger inhibition of the amplification. The sensitivity of the qPCR assay is lower when using larger amplicons, which could lead to false-negative results if the signal falls below the LOD.^{31,46} Therefore, optimizing a technique involves attaining a balance between the reduction of the qPCR signal in the dead cells and sensitivity. In our study, the qPCR technique, previously validated for diagnosis,¹⁷ used a set of primers that amplify a region of satellite DNA 166 bp long. Therefore, a larger target gene would probably help to completely eliminate the remaining signal of the dead parasites observed, although at the risk of reducing the sensitivity of the technique. Also, some studies suggest that the sequence of the target gene may influence the noncomplete amplification signal suppression from dead cells.^{47,48} Further research on enhancing the removal of the remaining signal of the dead parasites is necessary.

Some authors indicate that the ratio between live and dead cells can affect the performance of the method, considering that dead cells cannot exceed live cells by a factor of 1×10^3 without impacting on the PMA-qPCR.²⁵ Other authors, such as Pan and Breidt, have reported that the linear relationship between Cq and the number of viable cells of *Listeria monocytogenes* was affected when the ratio of dead cells exceeded 1×10^4 and the concentration of live cells was less than 1×10^3 CFU/mL.⁴⁹ Our results showed that the technique was capable of differentiating live *T. cruzi* from a live/dead parasite mixture, despite the high number of dead cells present in all samples. The technique failed only when a low concentration of live parasites was combined with a high concentration of dead parasites, which could be explained by a saturation of PMA by this high number of dead cells.²⁵

The PMA-qPCR strategy optimized in this study effectively differentiated between viable and nonviable epimastigotes of *T. cruzi*, with a significant reduction in the qPCR signal. This method has potential application in viability assessment and quantification due to its various advantages: it requires only a few hours to carry out, in comparison with an axenic culture that takes at least 20–30 days; its handling is simple and straightforward compared with RNA detection techniques; the use of the highly sensitive and specific TaqMan probe renders it suitable for application in, for example, raw food matrices, as it would avoid interference from bacteria or fungus, a problem in culture techniques. Nevertheless, this method has its limitations, as the reagents are expensive,

highly trained personnel are required for its application, and it is not always available in laboratories. It would be desirable if the method was tested by other laboratories and on other trypanosomatids.

The described method could therefore be especially useful in differentiating DNA from viable parasites in fields such as food security to prevent oral infections or study outbreaks, diagnostics to evaluate chemotherapeutic efficacy, research on vectors and reservoirs, or antitrypanosomal drug activity assays.

Received September 23, 2015. Accepted for publication March 7, 2016.

Published online May 2, 2016.

Acknowledgments: We thank Francesc Codony of the Laboratori de Microbiologia Sanitària i Mediambiental, Universitat Politècnica de Catalunya for providing his expertise in the design of the experiments and Lucy Brzoska for her invaluable advice on the preparation of the manuscript.

Financial support: This work is part of a research study supported by the National R&D+i Plan 2008–2011 and ISC III -Subdirecció General de Evaluació y Fomento de la Investigación (PI 10/00533), was in part funded by CONICYT Becas Chile (72130155) and is part of the project 2014 SGR 1241 de la Generalitat de Catalunya.

Authors' addresses: Beatriz Cancino-Faure, Roser Fisa, M. Magdalena Alcover, and Cristina Riera, Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, E-mails: mbcancino@gmail.com, rfisa@ub.edu, mmagdalenaalcoveramengual@ub.edu, and mcriteria@ub.edu. Teresa Jimenez-Marco, Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Balearic Islands, Spain, and IUNICS Institut Universitari d'Investigació en Ciències de la Salut, Universitat de les Illes Balears, Cra. de Valldemossa, Balearic Islands, Spain, E-mail: tjimenez@fbstib.org.

Reprint requests: Roser Fisa, Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Avinguda Joan XXIII s/n. E-08028, Barcelona, Spain, E-mail: rfisa@ub.edu; Tel: +34 934024502; Fax: +34 934024504.

REFERENCES

1. Steverding D, 2014. The history of Chagas disease. *Parasit Vectors* 7: 1–8.
2. WHO, 2012. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 975: 1–100.
3. Bern C, Montgomery SP, 2009. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 49: e52–e54.
4. Rassi A, Marin-Neto JA, 2010. Chagas disease. *Lancet* 375: 1388–1402.
5. Jackson Y, Gétaz L, Wolff H, Holst M, Mauris A, Tardin A, Sztajzel J, Besse V, Loutan L, Gaspoz JM, Jannin J, Albajar P, Luquetti A, Chappuis F, 2010. Prevalence, clinical staging and risk for blood-borne transmission of Chagas disease among Latin American migrants in Geneva, Switzerland. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e592.
6. Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL, 2008. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 21: 476–482.
7. Cancino-Faure B, Fisa R, Riera C, Bula I, Girona-Llobera E, Jimenez-Marco T, 2015. Evidence of meaningful levels of *Trypanosoma cruzi* in platelet concentrates from seropositive blood donors. *Transfusion* 55: 1249–1255.
8. Roca Saumell C, Soriano-Arandes A, Solsona Díaz L, Gascón Brustenga J, 2015. Documento de consenso sobre el abordaje de la enfermedad de Chagas en atención primaria de salud de áreas no endémicas. *Aten Primaria* 47: 308–317.

9. Nóbrega AA, Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, Araujo WN, 2009. Oral transmission of Chagas disease by consumption of Açai palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis* 15: 653–655.
10. Coura JR, Junqueira ACV, 2015. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. *Acta Trop* 151: 51–57.
11. Toso MA, 2011. Oral transmission of Chagas disease. *Rev Med Chil* 139: 258–266.
12. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet ED, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, Carvalho-Pinto CE, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, Savino W, Meis JD, 2015. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form from an old infection? *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003849.
13. Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vanni CM, Hasslocher-Moreno A, Xavier SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P, 1995. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241–247.
14. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, Svoboda M, 2003. Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg* 68: 574–582.
15. Schijman AG, Altcheh J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H, 2003. Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother* 52: 441–449.
16. Sánchez G, Coronado X, Zulantay I, Apt W, Gajardo M, Solari S, Venegas J, 2005. Monitoring the efficacy of specific treatment in chronic Chagas disease by polymerase chain reaction and flow cytometry analysis. *Parasite* 12: 353–357.
17. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat Jordi, Portús M, Sauleda S, 2007. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop* 103: 195–200.
18. Cominetti MC, Csordas BG, Cunha RC, Andreotti R, 2014. Geographical distribution of *Trypanosoma cruzi* in triatomine vectors in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 47: 747–755.
19. Herrera CP, Licon MH, Nation CS, Jameson SB, Wesson DM, 2015. Genotype diversity of *Trypanosoma cruzi* in small rodents and *Triatoma sanguisuga* from a rural area in New Orleans, Louisiana. *Parasit Vectors* 8: 1–9.
20. Chiari E, Dias JC, Lana M, Chiari CA, 1989. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 22: 19–23.
21. Luz ZMP, 1999. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl 1): 295–298.
22. Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Martínez G, Rojas A, Rodríguez J, 2013. Chronic Chagas disease: PCR-xenodiagnosis without previous microscopic observation is a useful tool to detect viable *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res* 46: 295–298.
23. Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K, 2003. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques* 34: 804–808, 810, 812–813.
24. Nocker A, Cheung C-Y, Camper AK, 2006. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods* 67: 310–320.
25. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F, 2012. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods* 91: 276–289.
26. Agustí G, Codony F, Fittipaldi M, Agrados B, Morató J, 2010. Viability determination of *Helicobacter pylori* using propidium monoazide quantitative PCR. *Helicobacter* 15: 473–6.
27. Josefsen MH, Löfström C, Hansen TB, Christensen LS, Olsen JE, Hoorfar J, 2010. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol* 76: 5097–5104.
28. Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM, Mas A, 2010. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 144: 257–262.
29. Fittipaldi M, Pino Rodríguez NJ, Agrados B, Agustí G, Peñuela G, Morató J, Codony F, 2011. Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction. *J Eukaryot Microbiol* 58: 359–364.
30. Li B, Chen J-Q, 2013. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food. *BMC Microbiol* 13: 273.
31. Alonso JL, Amorós I, Guy RA, 2014. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitol Res* 113: 2671–2678.
32. Rogers GB, Stressmann FA, Koller G, Daniels T, Carroll MP, Bruce KD, 2008. Assessing the diagnostic importance of non-viable bacterial cells in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62: 133–141.
33. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM, 2012. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert(R) MTB/RIF. *Eur Respir J* 39: 1269–1271.
34. De Oliveira-Silva JCV, Machado-de-Assis GF, Oliveira MT, Nogueira Paiva NC, Silva Araujo MS, Martins Carneiro C, Martins OA, Rodrigues Martins H, de Lana M, 2015. Experimental benzimidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* II strains isolated from children of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, with Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110: 86–94.
35. Caldas S, Caldas IS, Cecilio AB, Diniz LF, Talvani A, Ribeiro I, Bahia MT, 2014. Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benzimidazole-resistant parasite stock. *Parasitology* 141: 1–10.
36. Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese EA, Egorov AI, Villegas EN, 2009. *Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. *Appl Environ Microbiol* 75: 6856–6863.
37. Chang CW, Lu LW, Kuo CL, Hung NT, 2013. Density of environmental *Acanthamoeba* and their responses to superheating disinfection. *Parasitol Res* 112: 3687–3696.
38. De Assunção TM, Batista EL, Deves C, Villela AD, Pagnussatti VE, De Oliveira Dias AC, Kritski A, Rodrigues-Junior V, Basso LA, Santos DS, 2014. Real time PCR quantification of viable *Mycobacterium tuberculosis* from sputum samples treated with propidium monoazide. *Tuberculosis (Edinb)* 94: 421–427.
39. Kralik P, Nocker a, Pavlik I, 2010. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *Int J Food Microbiol* 141: S80–S86.
40. Løvdal T, Hovda MB, Björkblom B, Møller SG, 2011. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. *J Microbiol Methods* 85: 164–169.
41. Barbau-Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, Coucke W, Roosens NH, Botteldoorn N, 2014. Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. *J Microbiol Methods* 103: 131–137.
42. Cawthorn DM, Witthuhn RC, 2008. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *J Appl Microbiol* 105: 1178–1185.
43. Ditommaso S, Giacomuzzi M, Ricciardi E, Zotti CM, 2015. Viability-qPCR for detecting *Legionella*: comparison of two assays based on different amplicon lengths. *Mol Cell Probes* 29: 1–7.
44. Soejima T, Schlitt-Dittrich F, Yoshida S, 2011. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. *Anal Biochem* 418: 37–43.
45. Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A, 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J Microbiol Methods* 87: 89–95.

46. Opel KL, Chung D, McCord BR, 2010. A study of PCR inhibition mechanisms using real time PCR. *J Forensic Sci* 55: 25–33.
47. Chang B, Taguri T, Sugiyama K, Amemura-Maekawa J, Kura F, Watanabe H, 2010. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn J Infect Dis* 63: 119–123.
48. Dannelley JM, Boyce L, Gaubatz JW, 1986. Efficiency of photoaffinity labeling DNA homopolymers and copolymers with ethidium monoazide. *Photochem Photobiol* 43: 7–11.
49. Pan Y, Breidt F, 2007. Enumeration of viable *Listeria monocytogenes* cells by real-time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. *Appl Environ Microbiol* 73: 8028–8031.

4. DISCUSIÓN

4. DISCUSIÓN

La vía transfusional es uno de los principales mecanismos de transmisión de la enfermedad de Chagas tanto en áreas endémicas como en no endémicas (1). En áreas endémicas la cobertura del cribado de anticuerpos anti- *T. cruzi* casi alcanza el 100% de las unidades a transfundir, pero no ocurre lo mismo en las áreas no endémicas donde la situación de cada país es heterogénea. Ello conlleva un riesgo considerable para la seguridad transfusional, sobre todo en aquellos países en los que no existen políticas o estrategias para la detección y/o exclusión de los individuos en riesgo de la infección por *T. cruzi* (93). La ausencia de sintomatología en la fase crónica de la enfermedad, unido a que muchos individuos infectados no son conscientes de su situación y pueden ser donantes de sangre, posibilita que las donaciones de estas personas puedan transmitir la enfermedad de Chagas.

En aquellos países que no se realiza cribado serológico para *T. cruzi*, la única opción disponible para detectar a los potenciales donantes en riesgo de infección, es a través de la realización de la entrevista médica pre-donación a la que varios investigadores han asignado un valor bajo de sensibilidad. En el caso de la infección por *T. cruzi*. Steele y colaboradores (2014), hicieron un seguimiento entre los años 2000 y 2011 a donantes de sangre en EEUU, en el que detectaron que un porcentaje de donantes respondieron negativamente a las preguntas sobre la enfermedad de Chagas y posteriormente tanto el cribado de sus muestras como la confirmación de los anticuerpos anti-*T. cruzi* resultaron positivos (208). A partir de estos datos los investigadores concluyeron que cuando sólo se dispone de la entrevista médica, hay un mayor riesgo asociado de transmisión de la enfermedad. Lo mismo fue comunicado en un estudio realizado por O'Brien y colaboradores (2008) en Canadá, en el cual proponían incluir en la encuesta pre- donación no sólo preguntas sobre viajes a zonas endémicas sino también incluir el lugar de nacimiento (209).

El control de las unidades de sangre para la infección en España fue regulado mediante el Real Decreto sobre hemodonación (95) (Real Decreto 1088/2005) promulgado a finales del 2005 y que excluye de forma definitiva a los individuos con enfermedad de Chagas. A partir de ese año la mayoría de los centros de transfusión de España implementaron el escrutinio selectivo (por razones de coste) entre los donantes procedentes de zonas endémicas, detectados en la entrevista pre- donación. Son objeto de cribado los donantes

DISCUSIÓN

nacidos en países endémicos, los hijos o nietos de madres nacidas en países endémicos o que hayan recibido transfusión sanguínea en algún país endémico. El Real Decreto no incluye las personas nacidas en España que han residido en áreas endémicas, aun cuando algunos centros de transfusión las incluyen en el cribado (75).

Detección de donantes de sangre seropositivos con parasitemia y presencia de *T. cruzi* en los componentes sanguíneos.

Diferentes autores indican que los valores de seroprevalencia en países no endémicos pueden oscilar entre el 0,003% y el 1,38% (91, 92, 210–213). *En nuestro estudio entre los donantes de sangre provenientes de diferentes zonas endémicas, que actualmente viven en las Islas Baleares* (Artículo 1) hallamos valores de *seroprevalencia* de 1,91% IC_{95%} [1,26–2,78] de un total de 1201 donantes de sangre. Esta prevalencia es ligeramente superior a lo reportado por Piron y colaboradores en 2008 en Cataluña, que fue de 0,62% IC_{95%} [0,3–1,1] de un total de 1770 donantes (75). En Madrid, Algorta y colaboradores en 2006, reportaron valores de prevalencia de 0,61% IC_{95%} [0,36–1,01] de un total de 2456 donantes en riesgo (214). Estos valores, a pesar de su variabilidad, indican claramente que existe un riesgo considerable de TT de *T. cruzi* en España. De los donantes seropositivos incluidos en nuestro estudio, destacan los provenientes de Bolivia, quienes, como se ha citado en otros estudios (75) presentan una mayor prevalencia de la infección. La alta prevalencia hallada por nosotros (16,03%) entre la población boliviana, concuerda con los datos de prevalencia de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) (215), donde Bolivia está por encima de los demás países en el continente Americano.

El estudio de la población de donantes seropositivos y con parasitemia permitió detectar la población diana sobre la cual ahondar en los estudios de *cuantificación de la carga parasitaria* mediante la detección de DNA en sangre periférica por qPCR. Esta técnica utiliza como blanco una secuencia de 166 pb del DNA satélite de *T. cruzi*, que permite la detección de forma específica, además de la cuantificación de la carga parasitaria de forma sensible. La aplicación de la qPCR permitió en primer lugar detectar la presencia del parásito en la sangre total de los individuos seropositivos, y poder estudiar la distribución del parásito en el plasma y el concentrado de plaquetas obtenidos mediante aféresis. En el 60,9% de los donantes seropositivos estudiados se detectó la presencia del parásito en sangre total, con cargas parasitarias bajas, menores a 1 parásito equivalente/mL. Otros autores indican resultados similares, detectando la presencia de DNA parasitario en el

60,3% de los pacientes crónicos seropositivos (163). El hecho de que los pacientes chagásicos crónicos presenten cargas parasitarias bajas y oscilantes supone una limitación para el diagnóstico, tal como se demuestra en el artículo 1. Por ello, es importante la realización de réplicas tanto de la extracción de DNA como de la amplificación, que permitan incrementar la detección de DNA del parásito en casos de parasitemias bajas. En este trabajo se realizaron 9 amplificaciones de cada muestra, de los cuales no todas amplificaron, reflejo del límite de detección de la técnica (75). Es por esta razón que un resultado negativo de PCR para *T. cruzi* no indica que no exista infección por el parásito (216).

En el artículo 1 y 2 se estudió la *presencia de T. cruzi en los componentes sanguíneos obtenidos a través del sistema de aféresis de donantes seropositivos para la infección*. El sistema de aféresis, empleado de forma rutinaria en los bancos de sangre, permitió determinar una carga parasitaria promedio de cinco veces mayor en los concentrados de plaquetas estudiados en comparación con la detectada en sangre periférica. La carga parasitaria encontrada en el concentrado de plaquetas fue de $5,33 \pm 6,2$ parásitos equivalentes/mL. En el plasma no se detectó DNA parasitario en ninguna de las muestras, lo que coincide con los datos publicados en la literatura que describen al plasma como un componente sanguíneo no asociado o de bajo riesgo en la TT de *T. cruzi* (93) y al concentrado de plaquetas como el mayormente involucrado (79). Kessler y colaboradores (2010), realizaron un estudio retrospectivo de todas las donaciones anteriores al cribado implantado en el banco de sangre de aquellos donantes seropositivos para Chagas y encontraron un donante seropositivo con múltiples donaciones de aféresis anteriores, que transmitieron la infección a través de plaquetas a dos receptores, mientras que el concentrado de hematíes no transmitió la infección, por lo que ellos concluyen que estos casos apoyan al mayor riesgo de transmisión del parásito asociado a las plaquetas (217).

Los casos de transmisión publicados debido a la transfusión de plaquetas demuestran que los parásitos son capaces de sobrevivir en presencia de anticoagulantes y que tanto la leucorreducción mediante centrifugación como la irradiación- γ de este componente no eliminan el riesgo de transmisión (79,87).

Existen pocos estudios publicados que hagan referencia al riesgo de TT de *T. cruzi* por otros componentes sanguíneos. Benjamin y colaboradores (2012), indican que el riesgo de infectividad que tendrían los componentes sanguíneos sería de 0% IC_{95%} [0-1,5%] para el

DISCUSIÓN

concentrado de hematíes, 13,3% IC_{95%} [5,6-25,7%] para el concentrado de plaquetas y 0% IC_{95%}, [0-3,7%] para el plasma (79). Recientemente se ha descrito un caso de transmisión de *T. cruzi* por transfusión de un concentrado de hematíes (9). Ello motivó el estudio *de la presencia del parásito, de forma cuantitativa, en el concentrado de hematíes y en otros componentes sanguíneos* (Artículo 3). Al no ser *T. cruzi* un agente patógeno intracelular en sangre periférica es difícil saber en qué componentes sanguíneos se concentra. Ello difiere con lo que ocurre en otros parásitos intracelulares en los que los estudios publicados muestran que el riesgo de TT está directamente relacionado con el tipo de célula en el cual se localizan. Es el caso de *Babesia* o *Plasmodium*, en los cuales el riesgo está claramente asociado al concentrado de hematíes (218). Mediante la infección experimental de sangre total con epimastigotes y su posterior fraccionamiento clásico, hemos podido observar que una gran cantidad de parásitos se concentran junto con la placa leucoplaquetaria y otra importante cantidad se distribuyen en el concentrado de hematíes. Esto implica que el concentrado de hematíes previo a la leucorreducción presenta un elevado riesgo en la transmisión de *T. cruzi*, de hecho, el caso de TT descrito recientemente por concentrado de hematíes no especifica si este componente sanguíneo fue leucorreducido o no antes de transfundir, por otro lado demuestra que *T. cruzi* es capaz de sobrevivir en el concentrado de hematíes que se conserva a temperatura de refrigeración (4±2°C) (9).

Por otra parte, el hecho de encontrar las mayores cargas parasitarias en el concentrado de plaquetas obtenido por aféresis (Artículo 1) y en la placa leucoplaquetaria (Artículo 3) pone de manifiesto el gran riesgo asociado, ya descrito anteriormente, de TT de *T. cruzi* por este componente plaquetar. Si bien la fracción de placa leucoplaquetaria no se utiliza como un componente sanguíneo en sí, en Europa y Canadá se utiliza como fracción inicial para preparar el concentrado de plaquetas a partir de una mezcla (*pool*, en inglés) de placas leucoplaquetarias provenientes de 4-6 diferentes donantes con el mismo grupo sanguíneo ABO y Rh (219). El riesgo sería menor al diluirse una unidad infecciosa en 3 o 5 unidades provenientes de otro donante no infectado, comparado con el riesgo de transmisión de un concentrado de plaquetas obtenido por aféresis (equivalente a 4-6 unidades), desde un donante único infectado, debido a que la carga parasitaria sería mayor.

Una de las explicaciones de por qué el concentrado de plaquetas tiene una mayor carga parasitaria es la densidad específica de *T. cruzi*, que se encuentra en el rango de

los componentes de la capa leucoplaquetaria y por tanto, al centrifugar quedarían gran parte de los parásitos en esa fracción. Dos estudios realizados con sangre para el diagnóstico directo de *T. cruzi* demuestran que el parásito se concentra entre la capa leucoplaquetaria y la capa superior de los hematíes (220,221). Otro factor que implica el mayor riesgo asociado a este componente es la temperatura de almacenamiento ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) que permite mantener viable al parásito, así como a varios tipos de bacterias (222). Así mismo, el tipo de receptores que reciben plaquetas que suelen ser pacientes inmunodeprimidos, lo cual implica un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad. Las plaquetas son transfundidas principalmente a pacientes oncohematológicos, habitualmente pacientes politransfundidos lo cual les expone a un mayor riesgo de infección por agentes patógenos transmitidos por la sangre (178,179).

El plasma obtenido por fraccionamiento clásico presentó la menor concentración de parásitos, en comparación con el resto de componentes sanguíneos. Esta baja o nula presencia de parásitos en el plasma, concuerda con los resultados obtenidos en nuestro trabajo previo de plasmaféresis con muestras de donantes seropositivos considerados crónicos para la enfermedad de Chagas.

Evaluación de la leucorreducción mediante filtración, centrifugación y elutriación en la disminución la carga parasitaria presente en los componentes sanguíneos.

La utilidad de los filtros de leucorreducción ha sido estudiada para parásitos hemotísulares como *Leishmania* y *Plasmodium*. Cardo y colaboradores (2006), utilizando filtros de leucorreducción realizaron ensayos experimentales infectando sangre total con formas promastigotas y amastigotas de *Leishmania*, donde se evaluó la reducción de la carga parasitaria mediante filtración pre y post almacenamiento. Además de la eficacia en la eliminación de las formas extracelulares del parásito, se pudo observar que la eliminación del parásito fue completa tanto para amastigotes presentes dentro de los leucocitos como para los promastigotes libres, pre y post almacenamiento, indicando que los filtros serían una forma eficiente de eliminar el riesgo de TT de *Leishmania* (195). Otros estudios realizados en sangre total infectada con *Plasmodium* mostraron que los hematíes infectados se adherían a los filtros de leucorreducción indicando que cuando se altera la membrana de estas células, los filtros también son capaces de retenerlos (223).

En el caso de *T. cruzi*, existen pocos estudios sobre la eficacia de los filtros de leucorreducción y su capacidad para disminuir la carga parasitaria. Fabron y colaboradores

DISCUSIÓN

(1999), al igual que Cardo y colaboradores (2006), estudiaron mediante microscopía, la adhesión de formas tripomastigotas a las fibras de filtros leucorreductores, concluyendo que existiría una adhesión de tipo mecánica, a nivel molecular, donde las glicoproteínas de membrana del parásito interactuarían con las fibras del filtro permitiendo su adhesión y obteniéndose una reducción significativa de la carga parasitaria posterior al filtrado (197, 224). En un ensayo realizado por Moraes-Souza y colaboradores (1995), con sangre total infectada experimentalmente, estudiaron la efectividad de filtros de leucorreducción que tuviesen distinta capacidad en la reducción del número leucocitos, en disminuir las concentraciones de *T. cruzi*, y encontraron que cuanto mayor número de leucocitos era capaz de eliminar el filtro, mayor era la reducción en el número de parásitos y de forma dependiente a la concentración inicial (225).

La efectividad de la *leucorreducción mediante filtración* en reducir la carga parasitaria de *T. cruzi* ha sido estudiada en nuestros trabajos, donde se observó que la filtración aplicada sobre el *concentrado de hematíes* (Artículo 3) mostró una reducción significativa de un 99,9% de la concentración de los parásitos presentes. Así mismo, cuando fue aplicada sobre *sangre total experimentalmente infectada* (Artículo 4) se observó una reducción del 99,3% de la concentración de parásitos viables, por lo que de ambos trabajos se puede concluir la importancia que tiene la leucorreducción mediante filtros para disminuir el riesgo asociado a la TT de *T. cruzi*. Sin embargo, el riesgo no se eliminaría completamente debido a la persistencia de parásitos presentes en los componentes sanguíneos, aun cuando la carga parasitaria remanente sea baja. Algunos casos publicados de transmisión transfusional indican que los concentrados de plaquetas implicados en la infección habían sido previamente leucorreducidos (87). Se supone que la dosis infectante es baja debido a que los donantes involucrados son infectados crónicos (79, 89).

En países donde se realiza la *leucorreducción parcial, mediante centrifugación* y posterior separación de la placa leucoplaquetaria, y no la leucorreducción según los estándares europeos ($\leq 1 \times 10^6$ leucocitos por unidad) o americanos ($\leq 5 \times 10^6$ leucocitos por unidad), este método no sería lo suficientemente efectivo en la eliminación del riesgo de TT de *T. cruzi*, tal como lo indica nuestro trabajo (Artículo 3). Las fracciones provenientes de sangre total infectada (plaquetas, plasma y concentrado de hematíes), que fueron parcialmente leucorreducidas mediante la separación de la placa leucoplaquetaria, pero no filtradas, presentaron concentraciones parasitarias elevadas en el caso de las plaquetas y concentrado de hematíes e incluso del plasma, y mayores a las presentes en el concentrado de hematíes

filtrado. Así mismo, Dzib y colaboradores (2009), utilizando la centrifugación como método de separación de los componentes sanguíneos y de la placa leucoplaquetaria en donantes seropositivos para la enfermedad de Chagas, encontraron en al menos el 50% del concentrado de hematíes, el de plaquetas y en la placa leucoplaquetaria, DNA del parásito, por lo que ellos indican que la centrifugación no es un método totalmente eficaz en la reducción en el número de parásitos (226).

En nuestro estudio de plaqueto/plasmaféreis donde la leucorreducción se *realizó utilizando la elutriación* (Artículo 1 y 2) nuestros resultados indicaron que tanto las plaquetas como *T. cruzi* se hallan en la misma fracción debido a su tamaño y peso específico similar, concentrando los parásitos, lo que incrementa el riesgo de transmisión que posee este componente sanguíneo. No ocurrió lo mismo con el plasma donde no se encontró DNA parasitario en ninguna muestra.

Los mecanismos de leucorreducción estudiados, el uso de filtros de leucorreducción, la centrifugación en el fraccionamiento clásico y la elutriación empleada en las donaciones de aféresis, demuestran que el tipo de procedimiento mediante el cual se obtiene y procesa una unidad de sangre total afecta a las características de un determinado componente. Nuestros estudios, y el de otros autores (227) indican que no sería apropiado considerar como productos equivalentes componentes sanguíneos leucorreducidos por distintos métodos

Evaluación de TRP- riboflavina luz UV en la disminución de la carga parasitaria viable en sangre experimentalmente infectada.

A pesar de que se han logrado importantes avances en la reducción del riesgo de transmisión de infecciones por transfusión mediante la selección estricta de donantes de sangre y las pruebas de cribado; y aunque la probabilidad de transmisión es muy baja, aún no existe riesgo cero (228). Este riesgo está asociado al período ventana de la infección, a potenciales errores humanos en la obtención y/o procesamiento de las muestras y a la aparición de patógenos nuevos o emergentes.

Las tecnologías de reducción de patógenos (TRP) pueden incrementar la seguridad de la sangre reduciendo o eliminando incluso patógenos para los que en la actualidad no hay pruebas de escrutinio disponibles (205). Actualmente se están llevando a cabo varios estudios en plasma, plaquetas, concentrados de hematíes y sangre total aplicando las TRP,

DISCUSIÓN

con resultados positivos tanto para bacterias, virus como parásitos. Siendo las excepciones, los priones, virus sin envoltura y esporas provenientes de bacterias (229-233).

De entre todas las TRP, la riboflavina-luz UV es en estos momentos, la única plataforma desarrollada para reducir patógenos en sangre total, pero hasta la fecha no está disponible comercialmente, es por esta razón que se decidió junto con la casa comercial y la FBSTIB *evaluar de modo experimental en sangre total el sistema de TRP-riboflavina y luz UV asociado a la leucorreducción por filtración*, (Artículo 4) sistemas empleados de forma rutinaria en la FBSTIB para plaquetas y plasma.

Mediante qPCR y RT-qPCR específicas se cuantificó la carga y la viabilidad parasitaria detectándose una reducción importante (> 99%) de la concentración de *T. cruzi* posterior a la leucorreducción y una reducción completa (100%) después del tratamiento con riboflavina y luz UV. El sistema TRP aplicado en la sangre leucorreducida, que presentaba una carga parasitaria baja (40 parásitos vivos/mL), permitió la eliminación total de los parásitos. La metodología RT-qPCRs utilizada nos facilitó los estudios de viabilidad por su elevada sensibilidad, con un límite de detección de 1 parásito/mL, y su gran rapidez en la obtención de resultados. Esta herramienta molecular ha sido aplicada a otros parásitos kinetoplastidos como *Leishmania* para detectar infecciones activas en el caso de leishmaniasis de tipo cutánea en lesiones de pacientes infectados (234). También han sido empleadas en la detección de quistes viables de *Giardia lamblia* en muestras ambientales de aguas (235) o para determinar el estadio infectivo de gametocitos de *Plasmodium vivax* en muestras de sangre periférica de pacientes infectados (236).

Existen estudios experimentales previos de la TRP en plasma y plaquetas realizados por Cardo y colaboradores (2007). Estos autores estudiaron la reducción parasitaria mediante TRP-riboflavina y UV infectando plasma y plaquetas leucorreducidas obtenidas mediante aféresis, con 4×10^6 parásitos/mL, y encontraron que el tratamiento era capaz de eliminar el crecimiento *in vitro* de *T. cruzi* (237). Así mismo, Tonnetti y colaboradores (2012), estudiaron sangre total infectada con 400 y 4000 parásitos/mL y observaron una reducción de la carga parasitaria en el crecimiento *in vitro*. Cuando la concentración inicial fue de 40 y 4 parásitos/mL no se observó crecimiento del parásito. Medición realizada mediante hemocultivo y posterior recuento microscópico (238). Los dos estudios citados presentan como limitación la sensibilidad que los cultivos *in vitro* y la observación microscópica poseen. En el trabajo de Cardo y colaboradores (2007), anteriormente mencionado, el

límite de detección indicado fue de 100 parásitos/mL, valor muy por encima del límite de detección de la técnica de RT-qPCR llevada a cabo en nuestro trabajo. A pesar de que en los dos trabajos se observa una disminución del número de parásitos por mL es difícil concluir que hubo una eliminación total del parásito, debido al límite de detección de los cultivos.

Otros estudios *in vitro* e *in vivo* sobre *T. cruzi* evaluando el efecto del amotosaleno en plasma y plaquetas indican una reducción importante en la cantidad de parásitos posteriormente a la inactivación. Van Voorhis y colaboradores (2003), estudiaron la inactivación mediante amotosaleno tanto en plasma como en plaquetas experimentalmente infectadas con aproximadamente 1×10^6 tripomastigotes. Estos autores encontraron que la reducción en el número de parásitos tras el tratamiento estaba por debajo del límite de detección del cultivo (239). Así mismo, en otro estudio realizado con plaquetas provenientes de placa leucoplaquetaria experimentalmente infectadas con tripomastigotes de tres cepas de *T. cruzi*, pre y post tratamiento con amotosaleno encontraron tanto en cultivo *in vitro* como en infección en ratones, que el amotosaleno era efectivo en la eliminación de las tres cepas de *T. cruzi* al sobrevivir todos los ratones infectados con las plaquetas tratadas (240). Sin embargo, el tratamiento con amotosaleno no es aplicable a la sangre total ni al concentrado de hematíes. La alta densidad óptica de estos componentes sanguíneos hace que la dosis de luz ultravioleta necesaria para la inactivación sea demasiado grande, previniendo la acción del amotosaleno y produciendo hemólisis, debido a la absorción de luz UV por la hemoglobina presente (241, 242).

El uso de TRP-riboflavina y UV en nuestro estudio, permitió observar una eliminación total de los parásitos cuando la carga parasitaria es baja. Un donante de sangre infectado con *T. cruzi*, si es un paciente crónico, tendrá valores mucho más bajos de parásitos circulantes en sangre, que los usados para contaminar los componentes sanguíneos de forma experimental. De lo anterior se puede deducir que con bajas cargas parasitarias el uso de TRP-riboflavina UV es efectivo en la eliminación de *T. cruzi* en sangre total y que por tanto, este sistema podría ser utilizado en conjunto con otros mecanismos que permitan reducir el número de parásitos como es la leucorreducción por filtración, para asegurar una disminución en la carga inicial. Su uso en la rutina podría aminorar los costes al inactivar sólo un producto (sangre total) del que posteriormente se pueden obtener tres componentes (plaquetas, plasma y hematíes) ya fotoinactivados, que podrían ser inmediatamente transfundidos.

Viabilidad de *T. cruzi* mediante detección de DNA por la técnica de PMA- qPCR

Uno de los principales problemas que se plantean cuando se realizan estudios de detección del parásito es su viabilidad. Es sabido, que la PCR por sí sola no es capaz de diferenciar entre DNA proveniente de organismos vivos o muertos. La asociación entre viabilidad y presencia de DNA no es correcta, ya que este puede persistir en el tiempo sin ser degradado en un amplio tipo de muestras (243, 244, 245).

Como una forma de facilitar la *detección de la viabilidad* con herramientas que fuesen equiparables a nivel de sensibilidad y especificidad con la detección de RNA mediante RT-qPCR, pero eludiendo las dificultades de trabajar con RNA, en esta tesis se llevó a cabo el *diseño y la optimización de la técnica de PMA-qPCR específica para T. cruzi* (Artículo 5). Tanto EMA-PCR como PMA-PCR están siendo aplicadas sobre microorganismos, incluyendo bacterias, esporas bacterianas, hongos, virus y levaduras, principalmente en el campo medioambiental y de los alimentos (246–249). También han sido desarrollados para estudios con muestras clínicas, indicando que este método constituye una potencial herramienta diagnóstica así como su potencial uso en el seguimiento del tratamiento de enfermedades y en ensayos con fármacos (250,251). Sólo unos pocos estudios han sido aplicados en parásitos en estos años, siendo los ooquistes de *Cryptosporidium* spp., los quistes de *Giardia duodenalis* y los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba castellanii* los estudiados en muestras ambientales (252–255), así como en ooquistes de *Plasmodium* en los vectores (256).

Para el diseño y optimización de esta técnica se tomaron en cuenta varios de los factores más importantes documentados en la literatura que influirían en el rendimiento de la técnica para evitar tanto los resultados falsos positivos como los falsos negativos; como el tipo de colorante y la concentración utilizada, así como la fuente de luz con la que se realiza la fotoactivación. Cuando se comparan los dos colorantes utilizados en esta técnica se describe al PMA como un colorante más efectivo en la diferenciación entre células viables y no viables, mientras que EMA es ligeramente más eficiente en la eliminación de la señal de las células muertas, con la desventaja que puede penetrar en células vivas de algunos microorganismos (257,258). Por lo que en el diseño de este ensayo se decidió utilizar al PMA como colorante para pre-tratar a los epimastigotes. Así mismo, se describe que las lámparas de halógeno utilizadas en muchos de los ensayos han mostrado resultados dispares al no emitir una longitud de onda específica para el PMA además de producir

mucho calor que podría afectar a las muestras. En nuestro trabajo se utilizó una lámpara comercial diseñada especialmente para este tipo de ensayos, de tipo LED que emite luz azul en el rango visible del espectro permitiendo una óptima fotoactivación sin generación de calor. Algunos autores sugieren además, que la optimización de la técnica puede ser mejorada mediante la elección de un amplicón más largo a amplificar por la PCR. Esto debido a que mientras mayor sea la región amplificada mayor probabilidad de unión existirá con el colorante vital (259, 260). Algunos investigadores como Alonso y colaboradores, (2014) han comunicado una mejor reducción de la señal de quistes muertos de *Giardia duodenalis* cuando se utilizan amplicones con un mayor número de bases (253). Así mismo, Li y colaboradores, (2013) han encontrado esta misma correlación cuando trabajan con *Salmonella* spp., aunque observan que mientras mayor es el producto amplificado menor es la eficiencia de la qPCR (249), lo que se deberá tener en cuenta en el momento de elegir la longitud del amplicón para que exista un balance entre la reducción de la señal de la qPCR y la sensibilidad de ésta. En nuestro estudio (Artículo 5) la técnica de qPCR utilizada, previamente validada para el diagnóstico de *T. cruzi*, utiliza un par de cebadores que amplifican una región de 166 pb. Por lo tanto, probablemente con un producto de amplificación más largo se hubiese obtenido una mejor reducción en la amplificación de la señal de los epimastigotes no viables, aunque esta teoría no fue ensayada por nosotros, sería interesante realizar estudios en el futuro.

Tal como se observa en los resultados de nuestro trabajo (Artículo 5) cuando se realiza una qPCR para la detección de DNA de epimastigotes de *T. cruzi* vivos y muertos no existen diferencias en la señal de PCR, ambos ciclos de cuantificación (Cq) y ambas concentraciones son muy similares. En cambio, cuando se trató la muestra con PMA, previo a la qPCR para *T. cruzi*, se observó una reducción significativa en la señal de los parásitos no viables en comparación con los viables. Al optimizar la concentración de PMA, se obtuvo que con una concentración de 100 μM se logró la mejor diferencia entre la señal de qPCR de los parásitos viables de los no viables en todas las concentraciones de parásitos ensayadas, aunque con concentraciones sobre los 1×10^4 parásitos/mL se observó un remanente de la señal de qPCR, generando falsos positivos a estas concentraciones. Estudios realizados con bacterias indican resultados similares a los nuestros, donde el PMA es incapaz de eliminar por completo la señal de PCR de las células no viables (261–263). Fittipaldi y colaboradores (2007), señalan que una buena optimización en la concentración del PMA evitaría falsos positivos (170). En un trabajo realizado por estos

DISCUSIÓN

autores en *Acanthamoeba* aumentaron de 100 μM a 200 μM la concentración de PMA consiguiendo eliminar por completo la señal de qPCR en las células no viables (252). En nuestro estudio el aumento de la concentración de PMA no logró una mejora en la reducción de la señal de los epimastigotes muertos.

Algunos autores indican que el ratio entre células vivas y muertas afecta al desempeño de la técnica. Se considera que cuando existe una mezcla entre células vivas/muertas, las células muertas no debieran superar a las vivas en un factor de 1×10^3 (170). Nuestros resultados mostraron que la técnica de PMA-qPCR optimizada fue capaz de diferenciar entre parásitos de *T. cruzi* vivos cuando se encontraban dentro de una mezcla de parásitos vivos/muertos, a pesar del gran número de parásitos muertos presentes en la mezcla (1×10^5 parásitos/mL). La técnica falló sólo cuando una baja concentración de parásitos vivos se mezcló con gran cantidad de parásitos muertos, en una relación 1:10.000, lo que podría ser explicado por una saturación del PMA por el gran número de parásitos muertos presentes (170).

La técnica de PMA-qPCR optimizada en este estudio es capaz de diferenciar efectivamente entre epimastigotes de *T. cruzi* viables y no viables con una significativa reducción en la señal de qPCR. Este método tiene potencial aplicación en ensayos de viabilidad y cuantificación debido a que posee varias ventajas. Se requieren pocas horas para llevarlo a cabo en comparación con los cultivos que al menos requiere entre 20 a 30 días para obtener resultados. El manejo de la técnica y de las muestras es relativamente simple en comparación con las técnicas de detección de RNA. Sin embargo, la técnica también posee limitaciones, como el alto coste de los reactivos y equipamiento utilizado, además de ser una metodología que sólo es aplicable cuando existe daño en la membrana plasmática, debido a que el colorante es incapaz de atravesar membranas intactas. Esto lo hemos podido corroborar en ensayos realizados con plaquetas y sangre total artificialmente infectadas con el parásito (resultados no publicados) posterior al tratamiento con TRP-riboflavina UV. Se observó que el uso de la técnica de PMA-qPCR no es aplicable para el estudio de viabilidad de *T. cruzi* debido a que la riboflavina es capaz de ingresar en el parásito y dañar directamente el DNA posterior a la fotoactivación, sin dañar la membrana, además de competir ambos compuestos (riboflavina y PMA) por la unión a los ácidos nucleicos. Esto ha sido observado también en ensayos realizados con bacterias donde se utiliza luz UV como método de desinfección, la que induce daño del DNA sin afectar la permeabilidad de la membrana, por lo que la diferenciación entre vivos y

muertos no es posible debido a que el PMA no es capaz de atravesar la membrana (264).

La técnica de PMA-qPCR optimizada para la diferenciación de viabilidad mediante detección de DNA de *T. cruzi*, permitió diferenciar entre epimastigotes de *T. cruzi* viables y no viables. Estos resultados indican que podría ser una buena herramienta para ser utilizada en distintos campos de investigación, el campo de la seguridad alimentaria para prevenir infecciones orales o en el estudio de brotes orales, en diagnóstico para evaluar la eficacia quimioterapéutica, en la investigación de vectores y reservorios o en ensayos de actividad de drogas anti-trypanosomales.

5. CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. La seroprevalencia hallada en donantes de sangre provenientes de zonas endémicas de Chagas residentes en las islas Baleares ha sido del 1,9%, detectándose DNA del parásito mediante qPCR específica para *T. cruzi* en el 60,7% de los donantes seropositivos con cargas parasitarias de $0,42 \pm 0,32$ parásitos equivalentes/mL de sangre periférica.
2. La detección de DNA de *T. cruzi* en concentrado de plaquetas obtenidas mediante aféresis, que utiliza el sistema de leucorreducción por elutriación, ha permitido determinar que la carga parasitaria ($5,33 \pm 6,2$ parásitos equivalentes/mL) es 5 veces mayor a la detectada en la sangre periférica de los donantes seropositivos.
3. Los ensayos con componentes sanguíneos parcialmente leucorreducidos mediante fraccionamiento clásico por centrifugación, obtenidos a partir de sangre infectada artificialmente, indican que el concentrado de hematíes junto con la placa leucoplaquetaria son los que presentan la mayor carga parasitaria y el plasma la menor.
4. La elevada carga parasitaria encontrada en el concentrado de plaquetas provenientes de donantes seropositivos, obtenida mediante aféresis, y en la placa leucoplaquetaria obtenida por centrifugación en los estudios experimentales, pone de manifiesto el alto riesgo de transmisión transfusional asociado a las plaquetas y explica los casos de transmisión asociados a la transfusión de este componente publicados en la literatura.
5. La elevada carga parasitaria encontrada en el concentrado de hematíes obtenido por centrifugación a partir de sangre infectada artificialmente evidencia el riesgo de transmisión por transfusión por este componente sanguíneo, si no se leucorreduce.
6. La reducción del 99,9% de la carga parasitaria en el concentrado de hematíes leucorreducido por filtración, indica la efectividad de los filtros en la retención de *T. cruzi* y por ello la disminución del riesgo de transmisión por transfusión. Sin embargo, la presencia de un remanente de parásitos posterior al procedimiento no permite garantizar la eliminación total del riesgo de transmisión.
7. Las metodologías de leucorreducción de los componentes sanguíneos afectan a la presencia de *T. cruzi* en éstos, por lo que no se pueden considerar como productos equivalentes componentes sanguíneos leucorreducidos con métodos distintos.

CONCLUSIONES

8. La reducción mediante leucorreducción por filtración de un 99,3% de la carga parasitaria en la sangre total, indica la presencia de un remanente de parásitos viables, que pudo ser eliminado al 100% al utilizar posteriormente la tecnología de reducción de patógenos basada en riboflavina y luz UV; por lo que el uso combinado de ambos métodos se muestra adecuado para eliminar el riesgo de transmisión transfusional de *T. cruzi*.
9. La técnica PMA-qPCR *T. cruzi* diseñada, permite diferenciar entre epimastigotes viables y no viables de modo cuantitativo, con una reducción superior a 98% en la señal de la qPCR de los parásitos muertos, cuando se utiliza PMA a una concentración de 100 μM , excepto cuando la relación de vivos es mucho menor a la de muertos dentro de una mezcla.
10. El método de detección PMA-qPCR *T. cruzi* aparece como una herramienta capaz de diferenciar viabilidad de forma simple y precisa por medio de la detección de DNA, que puede ser aplicada en el ámbito del diagnóstico y de la investigación.

6. BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388–402.
2. Rodrigues Coura J, Albajar Viñas P. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010;s6–7.
3. Tanowitz HB, Weiss LM, Montgomery SP. Chagas disease has now gone global. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(4):4–5.
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). Nota descriptiva n° 340. 2016.
5. World Health Organization (WHO). Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. WHO Tech Rep Ser. 2012;(975):v – xii, 1–100.
6. Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49(5):e52–4.
7. Gascon J, Bern C, Pinazo M-J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):22–7.
8. Schmunis G, Yadon Z. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Trop*. 2010;115(1-2):14–21.
9. Blumental S, Lambermont M, Heijmans C, Rodenbach M-P, El Kenz H, Sondag D, *et al*. First Documented Transmission of *Trypanosoma cruzi* infection through blood transfusion in a child with sickle-cell disease in Belgium. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(10):e0003986.
10. Memòria 2014 Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears 2013 Disponible: http://www.fbstib.org/media/upload/pdf//memoria-2014-web1_editora_11_14_1.pdf
11. Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(5):1861–75.

12. Ruggiero MA, Gordon DP, Orrell TM, Bailly N, Bourgoin T, Brusca RC, *et al.* A higher level classification of all living organisms. *PLoS One*. 2015;10(4):1–60.
13. Miles M, Toye P, Oswald S, Godfrey D. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1977;71(3):217–25.
14. Miles M, Souza A, Povoá M, Shaw J, Lainson R, Toye P. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*. 1978;272(5656):819–21.
15. Morel C, Chiari E, Camargo EP, Mattei DM, Romanha a J, Simpson L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980;77(11):6810–4.
16. Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1997;30(1):27–35.
17. Tibayrenc M, Ayala F. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitol Today*. 1991;7(9):228–32.
18. Souto R, Fernandes O, Macedo a. M, Campbell D, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1996;83(2):141–52.
19. Kawashita SY, Sanson GF, Fernandes O, Zingales B, Briones MR. Maximum-likelihood divergence date estimates based on rRNA gene sequences suggest two scenarios of *Trypanosoma cruzi* intraspecific evolution. *Mol Biol Evol*. 2001;18(12):2250–9.
20. de Freitas JM, Augusto-Pinto L, Pimenta JR, Bastos-Rodrigues L, Gonçalves VF, Teixeira SMR, *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population Structure of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog*. 2006;2(3):e24.
21. Herrera C, Barges MD, Fajardo A, Montilla M, Triana O, Vallejo GA, *et al.* Identifying four *Trypanosoma cruzi* I isolate haplotypes from different geographic

- regions in Colombia. *Infect Genet Evol.* 2007;7(4):535–9.
22. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol.* 1998;28(1):85–104.
 23. Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:429–32.
 24. Tibayrenc M, Neubauer K, Barnabé C, Guerrini F, Skarecky D, Ayala FJ. Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(4):1335–9.
 25. Tibayrenc M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Advances in Parasitology.* London; 1995. p. 64–70.
 26. Brisse S, Dujardin JC, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;111(1):95–105.
 27. Tibayrenc M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003;2:12.
 28. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell D a., 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.* 2009;104(7):1051–4.
 29. Zingales B, Miles M a., Campbell D a., Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):240–53.
 30. Steven JR, Brisse S. Systematics of Trypanosome of medical and veterinary importance. In: Holmes P.H. MMAMI, editor. *The Trypanosomiasis.* Wallingford, Oxfordshire, UK.: CAB International; 2004. p. 1–23.
 31. Dvorak JA, Hyde TP. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro.

BIBLIOGRAFÍA

- Individual interactions at the cellular and subcellular levels. *Exp Parasitol.* 1973;34(2):268–83.
32. Viotti R, Vigliano C. Presentación clínica y etapas. *Enfermedad de Chagas un enfoque práctico basado en la investigación médica.* ed. Buenos Aires: Editorial médica Panamericana; 2015. p. 129–39.
 33. Apt W. *Tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas).* Parasitología humana. ed. MacGraw-Hill; 2013.
 34. Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Trop.* 2009;110(2-3):88–100.
 35. Lent H, Wygodzinsky PW. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the AMNH.* 1979;125–520.
 36. Galvão C, Justi SA. An overview on the ecology of Triatominae (Hemiptera:Reduviidae). *Acta Trop.* 2015;151(1):116–25.
 37. Herrera L. *Trypanosoma cruzi*, the causal agent of Chagas disease: boundaries between wild and domestic cycles in Venezuela. *Front public Heal.* 2014 Jan;2:259.
 38. Guhl F, Jaramillo C, Vallejo G, Cárdenas F, Arroyo-A, Aufderheide A. Chagas disease and human migration. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(4):553–5.
 39. Gurtler R, Cecere M, Lauricella M, Cardinal M, Kitron U, Cohen J. Domestic dogs and cats as sources of *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Parasitology.* 2007;134:69–82.
 40. González CR, Reyes C, Canals A, Parra A, Muñoz X, Rodríguez K. An entomological and seroepidemiological study of the vectorial-transmission risk of Chagas disease in the coast of northern Chile. *Med Vet Entomol.* 2015;29(4):387–92.
 41. Coura JR. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108:962–7.
 42. Rodríguez Coura J, Luiz de Abreu L, Willcox PF H, Petana W. Evaluation of the xenodiagnosis of chronic Chagas patients infected ten years or over in an area where

- transmission has been interrupted – Iguatama and pains, West Minas Gerais State, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1991;86(4):395–8.
43. Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014;109(7):856–62.
 44. Dias JCP. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(Suppl. 1):11–8.
 45. Pan American Health Organization (PAHO) /World health Organization (WHO). General Information-Chagas disease 2014.Disponible en: 856:2011-informacion-general-enfermedad- chagas&catid=1232:chagas&Itemid=41506&lang=en
 46. Schofield CJ, Diotaiuti L, Dujardin JP. The process of domestication in Triatominae. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999 Jan;94 Suppl 1:375–8.
 47. Jansen AM, Xavier SCC, Roque ALR. The multiple and complex and changeable scenarios of the *Trypanosoma cruzi* transmission cycle in the sylvatic environment. Acta Trop. Elsevier B.V.; 2015;1–15.
 48. Montgomery SP, Starr MC, Cantey PT, Edwards MS, Meymandi SK. Neglected Parasitic Infections in the United States: Chagas Disease. Am J Trop Med Hyg. 2014;90(5):814–8.
 49. Cantey PT, Stramer SL, Townsend RL, Kamel H, Ofafa K, Todd CW, *et al.* The United States *Trypanosoma cruzi* infection study: Evidence for vector- borne transmission of the parasite that causes Chagas disease among United States blood donors. Transfusion. 2012;52(9):1922–30.
 50. Carlier Y, Truyens C. Congenital Chagas disease as an ecological model of interactions between *Trypanosoma cruzi* parasites, pregnant women, placenta and fetuses. Acta Trop. 2015;1–13.
 51. Russomando G, de Tomassone MM, 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.* 1998;59(3):487–91.
52. Russomando G, Almirón M, Candia N, Franco L, Sánchez Z, de Guillen I. Implementation and evaluation of a locally sustainable system of prenatal diagnosis to detect cases of congenital Chagas disease in endemic areas of Paraguay. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005;38 Suppl 2:49–54.
53. Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, *et al.* Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;70(2):201–9.
54. Salas Clavijo NA, Postigo JR, Schneider D, Santalla JA, Brutus L, Chippaux J-P. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. *Acta Trop.* 2012;124(1):87–91.
55. García A, Bahamonde M, Verdugo S, Correa J, Pastene C, Solari A, *et al.* *Trypanosoma cruzi* transplacental infection: situation in Chile. *Rev Med Chil.* 2001;129(3):330–2.
56. Apt W, Zulantay I, Arnello M, Oddó D, González S, Rodríguez J, *et al.* Congenital infection by *Trypanosoma cruzi* in an endemic area of Chile: a multidisciplinary study. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013;107(2):98–104.
57. Rassi A, Amato Neto V, Rassi GG, Amato VS, Rassi Júnior A, Luquetti AO, *et al.* A retrospective search for maternal transmission of Chagas infection from patients in the chronic phase. *Rev Soc Bras Med Trop.* 37(6):485–9.
58. Martins-Melo FR, Lima M da S, Ramos AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. *Trop Med Int Heal.* 2014;19(8):943–57.
59. De Rissio AM, Riarte AR, García MM, Esteva MI, Quaglino M, Ruiz AM. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Efficacy of its monitoring in an urban reference health center in a non-endemic area of Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(5):838–45.
60. Sánchez Negrette O, Mora MC, Basombrío MA. High prevalence of congenital

- Trypanosoma cruzi* infection and family clustering in Salta, Argentina. *Pediatrics*. 2005;115(6):e668–72.
61. Carabarin-Lima A, González-Vázquez MC, Rodríguez-Morales O, Baylón- Pacheco L, Rosales-Encina JL, Reyes-López PA, *et al.* Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: An update. *Acta Trop*. 2013;127(2):126–35.
 62. Torrico F. Chagas congénito. In: Viotti R, Vigliano C, editors. *Enfermedad de Chagas Un enfoque práctico basado en la investigación médica*. ed. Buenos Aires: Editorial médica Panamericana; 2015. p. 117–28.
 63. Carlier Y, Torrico F, Sosa-Estani S, Russomando G, Luquetti A, Freilij H, *et al.* Congenital Chagas disease: Recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(10):4–6.
 64. Buekens P, Almendares O, Carlier Y, Dumonteil E, Eberhard M, Gamboa- Leon R, *et al.* Mother-to-Child transmission of Chagas' disease in north America: why don't we do more? *Matern Child Health J*. 2008;12(3):283–6.
 65. Fumadó V, Juncosa T, Posada E, Fisa R, Gállego M, Gascón J. Chagas pediátrico en zona no endémica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(5):293–6.
 66. Imai K, Maeda T, Sayama Y, Mikita K, Fujikura Y, Misawa K, *et al.* Mother-to-Child transmission of congenital Chagas disease, Japan. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(1):146–8.
 67. Leiby DA, Fucci M-CH, Stumpf RJ. *Trypanosoma cruzi* in a low- to moderate-risk blood donor population: seroprevalence and possible congenital transmission. *Transfusion*. 1999;39(3):310–5.
 68. Muñoz J, Portús M, Corachan M, Fumadó V, Gascon J. Congenital *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007;101(11):1161–2.
 69. Flores-Chávez M, Faez Y, Olalla JM, Cruz I, Gárate T, Rodríguez M, *et al.* Fatal congenital Chagas' disease in a non-endemic area: a case report. *Cases J*. 2008;1(1):302.

BIBLIOGRAFÍA

70. Jackson Y. Congenital transmission of Chagas Disease in Latin American immigrants in Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):601–3.
71. Generalitat Valenciana. Enfermedad de Chagas importada. Protocolo de actuación en la comunitat Valenciana. 2009.
72. Generalitat de Catalunya. Protocolo de cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés. 2010.
73. Wendel S. Transfusion-transmitted Chagas' disease. *Curr Opin Hematol.* 1998;5(6):406–11.
74. De Freitas J, Amato Neto V, Sonntag R, Biancalana A, Nussenzevig V, Barreto J. Primeiras verificações de transmissão acidental da moléstia de Chagas ao homem por transfusão de sangue. *Rev Paul Med.* 1952;40(1):36–40.
75. Piron M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, *et al.* Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion.* 2008;48(9):1862–8.
76. Cerisola A, Rabinovich A, Alvarez M, Di Corleto CA, Pruneda J. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bol Of Sanit Panam.* 1972;73(3):204–21.
77. Pinto Dias J, Brener S. Chagas' disease and blood transfusion. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984;79:139–47.
78. Bern C, Montgomery SP, Katz L, Caglioti S, Stramer SL. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(5):476–82.
79. Benjamin RJ, Stramer SL, Leiby D a., Dodd RY, Fearon M, Castro E. *Trypanosoma cruzi* infection in North America and Spain: Evidence in support of transfusion transmission (CME). *Transfusion.* 2012;52(9):1913–21.
80. 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.* 2015;55(6):1249–55.
81. Schmidt M, Geilenkeuser W-J, Sireis W, Seifried E, Hourfar K. Emerging pathogens - How safe is blood? *Transfus Med hemotherapy.* 2014;41(1):10–7.

82. Rojo Medina J. Enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión. Panorama internacional y en México. *Gac Med Mex.* 2014;150:78–83.
83. IPCA. XIV Reunión de la comisión intergubernamental de la iniciativa de los países de centroamérica (IPCA) para la interrupción de la transmisión vectorial , transfusional y atención médica de la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud. 2012.
84. Wendel S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control? *Acta Trop.* 2010;115(1-2):28–34.
85. Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the blood supply in Latin America. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):12–29.
86. Grant I, Gold J, Wittner M, Tanowitz H, Nathan C, Mayer K, *et al.* Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. *Ann Intern Med.* 1989;111:849–51.
87. Young C, Losikoff P, Chawla A, Glasser L, Forman E. Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection. *Transfusion.* 2007;47(3):540–4.
88. Nickerson P, Orr P, Schroeder M, Sekla L, Johnston J. Transfusion- associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. *Ann Intern Med.* 1989;111:851–3.
89. Flores-Chávez M, Fernández B, Puente S, Torres P, Rodríguez M, Monedero C, *et al.* Transfusional Chagas disease: parasitological and serological monitoring of an infected recipient and blood donor. *Clin Infect Dis.* 2008;46(5):e44–7.
90. AABB. Circular of information for the use of human blood and blood components. 2013.
91. O'Brien SF, Scalia V, Goldman M, Fan W, Yi Q-L, Dines IR, *et al.* Selective testing for *Trypanosoma cruzi*: the first year after implementation at Canadian Blood Services. *Transfusion.* 2013;53(8):1706–13.
92. Yasukawa K. Blood donor screening for *Trypanosoma cruzi* infection in Japan. *Transfusion.* 2014;54.

BIBLIOGRAFÍA

93. Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, *et al.* Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus.* 2015;13(4):540–50.
94. Comisión de las Comunidades Europeas. Directiva 2004/33/CE Parlamento Europeo y del Consejo en lo que se refiere a determinados requisitos técnicos de la sangre y los componentes sanguíneo. *Diario Oficial de la Unión Europea*; 2004.
95. Ministerio de Sanidad y Consumo. Real Decreto 1088/2005, de 16 de septiembre, por el que se establecen los requisitos técnicos y condiciones mínimas de la hemodonación y de los centros y servicios de transfusión. 2005.
96. Ministère de la santé et des sports. Arrêté du 12 janvier 2009 fixant les critères de sélection des donneurs de sang. 2009.
97. National Blood Service. Guidelines for the Blood Services in the United Kingdom. 2005.
98. Ministero della salute. Protocolli per l'accertamento della idoneità del donatore di sangue e di emocomponenti. 2005.
99. Requena-Mendez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascon J, Muñoz J. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(10):e3245.
100. Coura JR, Junqueira ACV. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. *Acta Trop.* 2015;151:51–7.
101. Nóbrega A a., Garcia MH, Tatto E, Obara MT, Costa E, Sobel J, *et al.* Oral transmission of Chagas disease by consumption of Açaí palm fruit, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):653–5.
102. Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet E De, Farias-de-Oliveira DA, *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form from an old infection? *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003849.

103. Pereira KS, Schmidt FL, Guaraldo a M a, Franco RMB, Dias VL, Passos L a C. Chagas' disease as a foodborne illness. *J Food Prot.* 2009;72(2):441–6.
104. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Guía para vigilancia, prevención, control y manejo clínico de la enfermedad de Chagas aguda transmitida por alimentos. 2009;1–49.
105. Alarcon de Noya B, Diaz Bello Z, Noya González O. La enfermedad de Chagas transmitida por vía oral. In: Viotti R, Vigliano C, editors. *Enfermedad de Chagas Un enfoque práctico basado en la investigación médica.* Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2015. p. 70–9.
106. Gomez-P CF, Mantilla-H JC, Rodriguez-Morales AJ. Fatal Chagas disease among solid-organ transplant recipients in Colombia. *Open Forum Infect Dis.* 2014;1(1):ofu032–ofu032.
107. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):659–88.
108. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. NTP 545: Prevención del riesgo biológico en el laboratorio: trabajo con parásitos. España; 2001.
109. Kinoshita-Yanaga AT, Toledo MJDO, Araújo SM De, Vier BP, Gomes ML. Accidental infection by *Trypanosoma cruzi* follow-up by the polymerase chain reaction: case report. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2009;51(5):295–8.
110. Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE, Remington JS. Laboratory- acquired Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(3):437–40.
111. Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. Chagas disease: The challenge of polyparasitism? *Trends Parasitol.* 2014;30(4):176–82.
112. Woo P. Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis of human trypanosomiasis and filariasis Evaluation of the haematocrit centrifuge and other techniques for the field diagnosis. *Acta Trop.* 1971;28:298–303.
113. Moody A, Chiodini P. Methods for the detection of blood parasites. *Clin Lab Haem.* 2000;22:189–202.

BIBLIOGRAFÍA

114. Freilij H, Altcheh J. Congenital Chagas' disease: Diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis.* 1995;21(3):551–5.
115. 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.* 2013;7(10):12–4.
116. Chiari E, Dias J, Lana M, Chiari C. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1989;22(1):19–23.
117. Luz ZMP. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94:295–8.
118. Luz Z, Coutinho M, Cañado J, Krettli A. Hemocultura: técnica sensível na detecção de *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1994;27:134–8.
119. Junqueira AC, Chiari E, Wincker P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996;90(2):129–32.
120. Castro a M, Luquetti a O, Rassi a, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res.* 2002;88:894– 900.
121. Fernandes AJ. Viabilidade da utilização da hemocultura no diagnóstico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em amostras coletadas em condições de campo. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1995;28.
122. Gomes ML, Galvao LMC, Macedo AM, Pena SDJ, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;60(2):205–10.
123. Brumpt E. O xenodiagnóstico, aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e em particular à trypanosome de Chagas. *Ann Paul Med e Cir.* 1914;3:97–102.

124. Barbosa W, Cândido Czerewuta A, Lopes de Oliveira R. Tentativa de isolamento primário de *T. cruzi* de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura. *Rev Pat Trop*. 1983;12(2).
125. Schenone H. Xenodiagnosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94:289–94.
126. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Gonzalez N, *et al*. Acute Chagas' disease in western Venezuela: A clinical, seroparasitologic, and epidemiologic study. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60(2):215–22.
127. Barretto A, Marsden P, Cuba C, Alvarenga N. Estudo preliminar sobre o emprego de *Dipetalogaster maximus* (Uhler, 1894) (Triatominae) na técnica do xenodiagnóstico em forma crônica de doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1978;20:183–9.
128. Camargo M. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1966;8(5):227–35.
129. Knierim F, Sandoval J, Munoz E. Indirect hemagglutination test in chronic Chagas disease. *Bol Chil Parasitol*. 1973;28:54–7.
130. Voller A, Draper C, Bidwell D, Bartlett A. Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. *Lancet*. 1975;305(7904):426–8.
131. World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease. WHO Tech Rep Ser. 2002;905:i – vi, 1–109.
132. Silveira-Lacerda EP, Silva AG, Junior SF, Souza MA, Kesper N, Botelho-Filho A, *et al*. Chagas' disease: application of TESA-blot in inconclusive sera from a Brazilian blood bank. *Vox Sang*. 2004;87(3):204–7.
133. Rojas A, Vinhães M, Rodríguez M, Monroy J, Persaud N, Aznar C, *et al*. Reunião internacional sobre vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia . implementação da iniciativa intergovernamental de vigilância e prevenção da doença de Chagas na Amazônia. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005;38(1):82–9.
134. Gomes YM, Lorena VM, 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. 2009;104:115–21.

135. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, *et al.* Short report: Identification of a western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. Am J Trop Med Hyg. 2012;86(3):412–6.
136. Umezawa ES, Nascimento MS, Kesper N, Coura JR, Borges-Pereira J, Junqueira a. C V, *et al.* Immunoblot assay using excreted-secreted antigens of *Trypanosoma cruzi* in serodiagnosis of congenital, acute, and chronic Chagas' disease. J Clin Microbiol. 1996;34(9):2143–7.
137. Brasil PEAA, 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. 2010;10(1):337.
138. Praast G, Herzogenrath J, Bernhardt S, Christ H, Sickinger E. Evaluation of the Abbott ARCHITECT Chagas prototype assay. Diagn Microbiol Infect Dis. Elsevier Inc.; 2011;69(1):74–81.
139. Iborra-Bendicho MA, Albert-Hernández M, Márquez-Contreras C, Segovia-Hernández M. ARCHITECT Chagas: una nueva herramienta diagnóstica en la enfermedad de Chagas. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(8):463–5.
140. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Marin-neto JA, Maguire JH, Acquatella H, *et al.* Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States a systematic review. JAMA. 2007;298(18):2171–81.
141. Virreira M, Torrico F, Truyens C, Alonso-Vega C, Solano M, Carlier Y, *et al.* Comparison of polymerase chain reaction methods for reliable and easy detection of congenital *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Trop Med Hyg. 2003;68(5):574–82.
142. Maria A, Duarte V, Andrade HM De, Jamil S, Paulo V De, Peixoto C, *et al.* Assessment of chemiluminescence and PCR effectiveness in relation to conventional serological tests for the diagnosis of Chagas ' disease Avaliação da eficiência da quimiluminescência e PCR em relação aos testes sorológicos convencionais para o diagnóstico. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39(4):385–7.

143. Batista AM, Aguiar C, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SCB. Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with megaesophagus. *Int J Infect Dis. International Society for Infectious Diseases*; 2010;14(11):e974–7.
144. Schijman AG. Conceptos y utilidad de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. In: Viotti R, Vigliano C, editors. *Enfermedad de Chagas Un enfoque práctico basado en la investigación médica*. ed. Ciudad de Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2015. p. 174–86.
145. 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*. 2013;13(12):3253–61.
146. 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*. 2007;7(6):1633–40.
147. Zhang L, Tarleton RL. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*. 1999;180(2):480–6.
148. Vago a R, Macedo a M, Oliveira RP, Andrade LO, Chiari E, Galvão LM, *et al.* Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am J Pathol*. 1996;149(6):2153–9.
149. Britto, C , Cardoso , M.A., Monteiro Vanni, C.M., Hasslocher-Moreno, A, Xavier, S.S., W. Oelemann, Santoro, A, Pirmez, C., Morel, C.M., Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*. 1995;110:241–7.
150. 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*. 1991;48(2):211–21.
151. Sturm NR, Degraeve W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Biochem Parasitol*. 1989;33(3):205–14.

152. Elias MCQB, Vargas NS, Zingales B, Schenkman S. Organization of satellite DNA in the genome of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;129(1):1–9.
153. Martins C, Baptista CS, Ienne S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2008;160(1):60–4.
154. Souto R, Zingales B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Mol Biochem Parasitol*. 1993;62(1):45–52.
155. Gonzalez N, Galindo I, Guevara P, Novak E, Scorza J V., Anez N, *et al.* Identification and detection of *Trypanosoma cruzi* by using a DNA amplification fingerprint obtained from the ribosomal intergenic spacer. *J Clin Microbiol*. 1994;32(1):153–8.
156. Brenière SF, Aliaga C, Waleckx E, Buitrago R, Salas R, Barnabé C, *et al.* Genetic Characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Wild *Triatoma infestans* from Bolivia: Predominance of TcI. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1650.
157. Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, *et al.* *Trypanosoma cruzi* Discrete Typing Units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitology*. 2012;139(04):516–21.
158. Enriquez GF, Cardinal M V., Orozco MM, Lanati L, Schijman a. G, Gürtler RE. Discrete typing units of *Trypanosoma cruzi* identified in rural dogs and cats in the humid Argentinean Chaco. *Parasitology*. 2013;140(03):303–8.
159. Ramírez JD, Guhl F, Rendón LM, Rosas F, Marin-Neto JA, Morillo CA. Chagas cardiomyopathy manifestations and *Trypanosoma cruzi* genotypes circulating in chronic chagasic patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e899.
160. 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*. 2015;8(1):1–7.
161. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(7):1–8.

162. Duffy T, Bisio M, Altchek 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.* 2009;3(4):e419.
163. 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.* 2013;7(1):e2000.
164. 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.* 2015;17(5):605–15.
165. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63.
166. Thekisoe OMM, Kuboki N, Nambota A, Fujisaki K, Sugimoto C, Igarashi I, *et al.* Species-specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for diagnosis of trypanosomiasis. *Acta Trop.* 2007;102(3):182–9.
167. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: Pitfalls and potential. *Biotechniques.* 1999;26(1):112–25.
168. Nogva HK, Drømtorp SM, Nissen H, Rudi K. Ethidium monoazide for DNA-based differentiation of viable and dead bacteria by 5'-nuclease PCR. *Biotechniques.* 2003 Apr;34(4):804–8, 810, 812–3.
169. Nocker A, Cheung C-Y, Camper AK. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J Microbiol Methods.* 2006 Nov;67(2):310–20.
170. Fittipaldi M, Nocker A, Codony F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods.* 2012;91(2):276–89.
171. Poel CL Van Der, Seifried E, Schaasberg WP. Paying for blood donations : still a

risk? *Vox Sang.* 2002;285–93.

172. Ben Jemia R, Gouider E. Seroprevalency of transfusion-transmitted infections in first-time volunteer and replacement donors in Tunisia. *Transfus Clin Biol.* 2014;21(6):303–8.
173. Nanu A, Sharma SP, Chatterjee K, Jyoti P. Markers for transfusion- transmissible infections in North Indian voluntary and replacement blood donors : Prevalence and trends 1989 – 1996. *Vox Sang.* 1997;73:70–3.
174. Leparc G. Safety of the blood supply. *Cancer Control.* 2015;22(1):7–15.
175. Cid J, Magnano L, Lozano M. Automation of blood component preparation from whole blood collections. *Vox Sang.* 2014;107(1):10–8.
176. Pasqualetti D, Ghirardini A, Arista MC, Vaglio S, Fakeri A, Waldman AA, *et al.* Blood component fractionation: Manual versus automatic procedures. *Transfus Apher Sci.* 2004;30(1):23–8.
177. Figdor G, Preijers F, Huijbens R, Ruijs P, de Witte T, Bont W. Centrifugal elutriation: a powerful separation technique in cell biology, immunology and hematology. In: Recktenwald D, Radbruch A, editors. *Cell separation methods and applications.* New York: Marcel Dekker inc.; 1997. p. 43–59.
178. Garraud O, Cognasse F, Tissot J-D, Chavarin P, Laperche S, Morel P, *et al.* Improving platelet transfusion safety: biomedical and technical considerations. 2015;16:1–14.
179. Kaufman RM, Djulbegovic B, Gernsheimer T, Kleinman S, Tinmouth AT, Capocelli KE, *et al.* Platelet transfusion: A clinical practice guideline from the AABB. *Ann Intern Med.* 2015;162(3):205–13.
180. Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. *Transfusion.* 1991;31(6):547–57.
181. Wendel S, Gonzaga AL. Chagas' disease and blood transfusion: a New world problem? *Vox Sang.* 1993;64(1):1–12.

182. Sullivan T.D. Viability of *Trypanosoma cruzi* in citrated blood stored at room temperature. *J Parasitol.* 1944;30(3):200.
183. Martin DL, Goodhew B, Czaicki N, Foster K, Rajbhandary S, Hunter S, *et al.* *Trypanosoma cruzi* survival following cold storage: possible implications for tissue banking. *PLoS One.* 2014;9(4):e95398.
184. Taylor-Wiedeman J, Sissons JGP, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human *Cytomegalovirus* in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991;72(1991):2059–64.
185. Marano G, Vaglio S, Pupella S, Facco G, Catalano L, Piccinini V, *et al.* Human T-lymphotropic virus and transfusion safety: does one size fit all? *Transfusion.* 2016;56:249–60.
186. La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11):2715–27.
187. Mettelle FC, Salata KF, Belanger KJ, Casleton BG, Kelly DJ. Reducing the risk of transfusion-transmitted rickettsial disease by WBC filtration, using *Orientia tsutsugamushi* in a model system. 2000;40:290–6.
188. Sharma RR, Marwaha N. Leukoreduced blood components: Advantages and strategies for its implementation in developing countries. *Asian J Transfus Sci.* 2010;4(1):3–8.
189. American Association of Blood Banks. Leukocyte reduction. *AABB Association Bulletin #99-7.* 1999.
190. Council of Europe. Guide to the preparation , use and quality assurance of blood components. 18th ed. Strasbourg; 2015.
191. Bassuni WY, Blajchman MA, Al-Moshary MA. Why implement universal leukoreduction? *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* 2008;1(2):106–23.
192. Beckman N, Sher G, Masse M, Richter E, Ringwald J, Rebullá P, *et al.* Review of the Quality Monitoring Methods Used by Countries Using or Implementing Universal Leukoreduction. *Transfus Med Rev.* 2004;18(1):25– 35.
193. Lieberman L, Devine D V, Reesink HW, Panzer S, Wong J, Raison T, *et al.*

BIBLIOGRAFÍA

Prevention of transfusion-transmitted *Cytomegalovirus* (CMV) infection: Standards of care. *Vox Sang.* 2014;1–36.

194. Dzik W. Use of leukodepletion filters for the removal of bacteria. *Immunol Invest.* 1995;24(1-2):95–115.
195. Cardo LJ, Salata J, Harman R, Mendez J, Weina PJ. Leukodepletion filters reduce *Leishmania* in blood products when used at collection or at the bedside. *Transfusion.* 2006;46(6):896–902.
196. Riera C, Fisa R, López-Chejade P, Serra T, Girona E, Jimenez MT, *et al.* Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* 2008;48:1383–9.
197. Cardo LJ, Asher L. Electron micrographic study of the removal of *Trypanosoma cruzi* from blood products by leukodepletion filters. *Transfusion.* 2006;46(7):1067–8.
198. Sweeney JD. Universal leukoreduction of cellular blood components in 2001? *Am J Clin Pathol.* 2001;115(5):666–73.
199. Strumper-Groves D. Perioperative blood transfusion and outcome. *Curr Opin Anesthesiol.* 2006;19:198–206.
200. Aguado Romero MJ. Leucorreducción universal de productos sanguíneos. Ministerio de consumo y Sanidad de España; 2007.
201. Mendrone A, Fabron A, Langhi D, Covas DT, Dinardo CL, Ubiali EA, *et al.* Is there justification for universal leukoreduction? *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2014;36(4):237.
202. Ratko TA, Cummings JP, Oberman HA, Crookston KP, Dechristopher PJ, Eastlund DT, *et al.* Evidence-based recommendations for the use of WBC- reduced cellular blood components. *Transfusion.* 2001;41:1310–9.
203. Goodnough LT, Shander A, Brecher ME. Transfusion medicine: Looking to the future. *Lancet.* 2003;361(9352):161–9.
204. Roddie P, Turner M, Williamson L. Leucocyte depletion of blood components. *Blood Rev.* 2000;14:145–56.

205. Goodrich RP, Ettinger A, Radziwon PM, Rock G. Improving blood safety and patient outcomes with pathogen reduction technology. *Transfus Apher Sci.* Elsevier Ltd; 2011;45(3):229–38.
206. Hardwick CC, Herivel TR, Hernandez SC, Ruane PH, Goodrich RP. Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochem Photobiol.* 2004;80:609–15.
207. Ministerio de Sanidad Servicios Sociales e Igualdad de España. Cuestionario unificado para la selección de donantes de sangre y componentes sanguíneos. 2004. p 28–31. Disponible:<http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/medicinaTransfusional/acuerdos/docs/cuestionarioUnificado.pdf>
208. Steele WR, Hewitt EH, Kaldun AM, Kryzstof DE, Dodd RY, Stramer SL. Donors deferred for self-reported Chagas disease history: does it reduce risk? *Transfusion.* 2014;54(8):2092–7.
209. O'Brien SF, Chiavetta JA, Fan W, Xi G, Yi Q-L, Goldman M, *et al.* Assessment of a travel question to identify donors with risk of *Trypanosoma cruzi*: operational validity and field testing. *Transfusion.* 2008;48(4):755–61.
210. Assal A, Corbi C. Maladie de Chagas et transfusion sanguine : un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. *Transfus Clin Biol.* 2011;18(2):286–91.
211. Ontañón A, Romon I, Amunarriz C, Hermosa V. Evaluation of a strategy for *Trypanosoma cruzi* screening and its impact on blood donation, XVIIth Regional Congress of the ISBT Europe. *Vox Sang.* 2007;93(suppl 1):142.
212. Castro E. Transfusión sanguínea y enfermedad de Chagas: iniciativas en Centros de Transfusión de España. *Enf Emerg.* 2006;8(1):48–50.
213. Slot E, Hogema BM, Molier M, Zaaijer HL, Hogema BM, Zaaijer HL, *et al.* Risk Factors and Screening for *Trypanosoma cruzi* Infection of Dutch Blood Donors. *PLoS One.* 2016;11(3):e0151038.
214. Algora M, Torres P, Ariza B, Moreno R, Herrero M, Martinez M, *et al.*

BIBLIOGRAFÍA

- Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors in Madrid area, XVIIth Regional Congress of the ISBT Europe. Vox Sang. 2007;93(suppl 1):87.
215. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Organización Mundial de la Salud. 2006.
216. Bern C. Chagas' disease. N Engl J Med. 2015;373(5):456–66.
217. Kessler D, Grima K, Hillyer C. Chagas transmission identified by lookback. Transfusion. 2010;50(suppl 1):Abstract 31A.
218. Dodd RY. Transmission of parasites by blood transfusion. Vox Sang. 1998;74:161–3.
219. Kaufman RM. Principles of platelet transfusion therapy. Hematology: Basic Principles and Practice. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2013. p. 1653–8.
220. Amato Neto V, Matsubara L, Bustos Lanura P. Avaliação do sistema quantitativo buffycoat (qbc) no diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: estudo em modelo experimental murino. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 1996;29(1):59–61.
221. Ferreira C, Bezerra R, Pinheiro A. Methylene blue vital staining for *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and epimastigotes. Rev. Inst. Med. Trop Sao Paulo 2006;48(6):347–9.
222. Benjamin RJ, McDonald CP. The international experience of bacterial screen testing of platelet components with an automated microbial detection system: A need for consensus testing and reporting guidelines. Transfus Med Rev. 2014;28(2):61–71.
223. Cardo LJ, Salata J, Wilder D. Removal of *Plasmodium falciparum*-infected red blood cells from whole blood by leukoreduction filters. Transfusion. 2009;49(2):337–46.
224. Fabron Junior A, Bordin JO, Moraes-souza H, Freymüller E, Lages-silva E. Removal of *Trypanosoma cruzi* by white cell-reduction filters: an electronmicroscopic study. Rev Soc Bras Med Trop. 1999;32(3):223–7.
225. Moraes-Souza H, Bordin JO, Bardossy L, MacPherson DW, Blajchman MA. Prevention of transfusion-associated Chagas' disease: efficacy of white cell- reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. Transfusion.

- 1995;35(9):723–6.
226. Dzib D, Hernández VP, Ake BC, López RA, Monteón VM. Leukoreduction by centrifugation does not eliminate *Trypanosoma cruzi* from infected blood units. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2009;9(3):235–41.
227. Glenister KM, Sparrow RL. Level of platelet-derived cytokines in leukoreduced red blood cells is influenced by the processing method and type of leukoreduction filter. *Transfusion.* 2010;50(1):185–9.
228. Aubuchon JP. Update on the status of pathogen inactivation methods. *ISBT Sci Ser.* 2011;6:181–8.
229. Marschner S, Goodrich R. Pathogen reduction technology treatment of platelets, plasma and whole blood using riboflavin and UV light. *Transfus Med Hemotherapy.* 2011;38(1):8–18.
230. Mohr H, Steil L, Gravemann U, Thiele T, Hammer E, Greinacher A, *et al.* A novel approach to pathogen reduction in platelet concentrates using short- wave ultraviolet light. *Transfusion.* 2009;49(12):2612–24.
231. Irsch J, Lin L. Pathogen inactivation of platelet and plasma blood components for transfusion using the INTERCEPT blood system. *Transfus Med Hemotherapy.* 2011;38(1):19–31.
232. Ruane PH, Edrich R, Gampp D, Keil SD, Leonard RL, Goodrich RP. Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion.* 2004 Jan;44:877–85.
233. Stramer SL, Hollinger FB, Katz LM, Kleinman S, Metzler PS, Gregory KR, *et al.* Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion.* 2009;49:1S – 29S.
234. Adams ER, Schoone GJ, Ageed AF, El Safi S, Schallig HDFH. Development of a reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the sensitive detection of *Leishmania* parasites in clinical samples. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;82(4):591–6.

235. Baque RH, Gilliam AO, Robles LD, Jakubowski W, Slifko TR. A real-time RT-PCR method to detect viable *Giardia lamblia* cysts in environmental waters. *Water Res.* Elsevier; 2011;45(10):3175–84.
236. Vallejo AF, García J, Amado-Garavito AB, Arévalo-Herrera M, Herrera S. *Plasmodium vivax* gametocyte infectivity in sub-microscopic infections. *Malar J.* BioMed Central; 2016;15(1):48.
237. Cardo LJ, Salata J, Mendez J, Reddy H, Goodrich R. Pathogen inactivation of *Trypanosoma cruzi* in plasma and platelet concentrates using riboflavin and ultraviolet light. *Transfus Apher Sci.* 2007;37(2):131–7.
238. Tonnetti L, Thorp AM, Reddy HL, Keil SD, Goodrich RP, Leiby Da. Evaluating pathogen reduction of *Trypanosoma cruzi* with riboflavin and ultraviolet light for whole blood. *Transfusion.* 2012;52(2):409-16.
239. Van Voorhis WC, Barrett LK, Eastman RT, Alfonso R, Dupuis K. *Trypanosoma cruzi* inactivation in human platelet concentrates and plasma by a psoralen (Amotosalen HCl) and long-wavelength UV. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(2):475–9.
240. Castro E, Gironés N, Bueno JL, Carrión J, Lin L, Fresno M. The efficacy of photochemical treatment with amotosalen HCl and ultraviolet a (INTERCEPT) for inactivation of *Trypanosoma cruzi* in pooled buffy-coat platelets. *Transfusion.* 2007;47:434–41.
241. Schlenke P. Pathogen inactivation technologies for cellular blood components: An update. *Transfus Med Hemotherapy.* 2014;41:309–25.
242. Mundt JM, Rouse L, Van Den Bossche J, Goodrich RP. Chemical and biological mechanisms of pathogen reduction technologies. *Photochem Photobiol.* 2014;90:957–64.
243. Jamil S, Keer J, Lucas S, Dockrell H, Chiang T, Hussain R, *et al.* Use of polymerase chain reaction to assess efficacy of leprosy chemotherapy. *Lancet.* 1993;342:264–8.
244. Deere D, Porter J, Pickup RW, Edwards C. Survival of cells and DNA of *Aeromonas salmonicida* released into aquatic microcosms. *J Appl Bacteriol.* 1996;81(3):309–18.

245. Masters CI, Shallcross JA, Mackey BM. Effect of stress treatments on the detection of *Listeria monocytogenes* and enterotoxigenic *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol.* 1994;77(1):73–9.
246. Agustí G, Codony F, Fittipaldi M, Adrados B, Morató J. Viability determination of *Helicobacter pylori* using propidium monoazide quantitative PCR. *Helicobacter.* 2010; 15(5):473–6.
247. Josefsen MH, Löfström C, Hansen TB, Christensen LS, Olsen JE, Hoorfar J. Rapid quantification of viable *Campylobacter* bacteria on chicken carcasses, using real-time PCR and propidium monoazide treatment, as a tool for quantitative risk assessment. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(15):5097– 104.
248. Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM, Mas A. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J Food Microbiol.* 2010;144(2):257–62.
249. Li B, Chen J-Q. Development of a sensitive and specific qPCR assay in conjunction with propidium monoazide for enhanced detection of live *Salmonella* spp. in food. *BMC Microbiol.* 2013;13:273.
250. Rogers GB, Stressmann FA, Koller G, Daniels T, Carroll MP, Bruce KD. Assessing the diagnostic importance of nonviable bacterial cells in respiratory infections. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(2):133–41.
251. Miotto P, Bigoni S, Migliori GB, Matteelli A, Cirillo DM. Early tuberculosis treatment monitoring by Xpert(R) MTB/RIF. *Eur Respir J.* 2012;39(5):1269– 71.
252. Fittipaldi M, Pino Rodriguez NJ, Adrados B, Agustí G, Peñuela G, Morató J, *et al.* Discrimination of viable *Acanthamoeba castellanii* trophozoites and cysts by propidium monoazide real-time polymerase chain reaction. *J Eukaryot Microbiol.* 2011;58(4):359–64.
253. Alonso JL, Amorós I, Guy R a. Quantification of viable *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in wastewater using propidium monoazide quantitative real-time PCR. *Parasitol Res.* 2014;113(7):2671–8.
254. Brescia CC, Griffin SM, Ware MW, Varughese E a., Egorov AI, Villegas EN.

- Cryptosporidium* propidium monoazide-PCR, a molecular biology-based technique for genotyping of viable *Cryptosporidium* oocysts. Appl Environ Microbiol. 2009;75(21):6856–63.
255. Chang CW, Lu LW, Kuo CL, Hung NT. Density of environmental *Acanthamoeba* and their responses to superheating disinfection. Parasitol Res. 2013;112(11):3687–96.
256. Habtewold T, Groom Z, Duchateau L, Christophides GK. Detection of viable plasmodium ookinetes in the midguts of *Anopheles coluzzi* using PMA- qrtPCR. Parasit Vectors. 2015;8(1):455.
257. Cawthorn DM, Witthuhn RC. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. J Appl Microbiol. 2008;105(4):1178–85.
258. Pan Y, Breidt F. Enumeration of Viable *Listeria monocytogenes* cells by Real-Time PCR with propidium monoazide and ethidium monoazide in the presence of dead cells. Appl Environ Microbiol. 2007;73(24):8028–31.
259. Soejima T, Schlitt-Dittrich F, Yoshida S. Polymerase chain reaction amplification length-dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed cells of *Enterobacteriaceae*. Anal Biochem. 2011;418(1):37–43.
260. Contreras PJ, Urrutia H, Sossa K, Nocker A. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. J Microbiol Methods. 2011;87(1):89–95.
261. Kralik P, Nocker A, Pavlik I. *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. Int J Food Microbiol. 2010;141:S80–6.
262. Løvdal T, Hovda MB, Björkblom B, Møller SG. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR underestimates heat-killed *Listeria innocua*. J Microbiol Methods. 2011;85(2):164–9.
263. Barbau-Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, Coucke W, Roosens NH, Botteldoorn N. Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. J Microbiol Methods. 2014;103:131–7.

264. Nocker A, Sossa KE, Camper AK. Molecular monitoring of disinfection efficacy using propidium monoazide in combination with quantitative PCR. *J Microbiol Methods*. 2007;70(2):252–60.