



Universitat Autònoma de Barcelona

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

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

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

Universitat Autònoma de Barcelona

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina

Programa de doctorado en Medicina

**IMPACTO DE LA COINFECCIÓN POR
GEOHELMINTOS EN PACIENTES CON
ENFERMEDAD DE CHAGAS**

Tesis presentada por

FERNANDO SALVADOR VÉLEZ

Para optar al grado de Doctor.

Director:

ISRAEL MOLINA ROMERO

Tutor:

CARLES PIGRAU SERRALLACH

Febrero de 2018

Israel Molina Romero, Director del Programa de Salud Internacional del Instituto Catalán de la Salud (PROSICS) y Médico Adjunto del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d’Hebron

Y

Carles Pigrau Serrallach, Profesor Titular de la Facultad de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona y Jefe Clínico del Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d’Hebron

Certifican que la tesis titulada:

“Impacto de la coinfección por geohelminetos en pacientes con enfermedad de Chagas”

Que presenta el licenciado **Fernando Salvador Vélez**, ha sido realizada bajo su dirección en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Universitario Vall d’Hebron, la consideran finalizada y autorizan su presentación para que sea defendida ante el tribunal que corresponda.

Dr. Israel Molina Romero

Dr. Carles Pigrau Serrallach

En Barcelona, 14 de Febrero de 2018

A mis padres y mi familia, todo es gracias a ellos.

“No acostumbro a decir nada con seguridad tras solo una o dos observaciones”.

Andrés Vesalio (*Carta sobre la raíz de China*, 1546).

AGRADECIMIENTOS

Sin lugar a dudas, la primera persona a la que le tengo que dar las gracias es Israel. No solo por ser el director de mi tesis (probablemente eso es lo menos importante), sino también por ser un gran compañero de trabajo y, sobre todo, mi amigo. Gracias por darme la oportunidad de participar en el proyecto de crear una unidad de medicina tropical casi desde el principio; ha sido y es realmente apasionante. Gracias por ser exigente con el trabajo y a la vez dar gran libertad. Gracias por la paciencia y el tiempo invertido en mí y en tantas personas. Solo espero estar a la altura.

Gracias a Carles, por ser el tutor de mi tesis y por enseñarme desde mis primeros días en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Vall d'Hebron que nunca hay que perder la ilusión y la curiosidad por aprender cosas nuevas. Es un consejo que espero aplicar durante toda mi vida profesional y también personal.

Gracias también al Servicio de Enfermedades Infecciosas, por haberme hecho sentir parte de un equipo desde el primer minuto en que entré como residente, por la gran capacidad de docencia (he aprendido cosas de todas las personas con las que he estado) y por transmitir la necesidad del rigor científico a la hora de tomar decisiones.

Tengo la suerte de tener una segunda familia laboral, el Programa de Salud Internacional del ICS (PROSICS). Quiero hacer una mención especial a la gente de Drassanes y de Metropolitana Nord, grupos con larga experiencia en la Medicina Tropical y que son un referente a nivel profesional; es todo un lujo trabajar con ellos. Y, por supuesto, gracias a los compañeros con los que tengo el placer de compartir el día a día (Adrián, Esperanza, Elena, Dani, Eva), con los que compagino trabajo y amistad.

Gracias también a la gente del Hospital Nossa Senhora da Paz de Cubal, y especialmente a Milagros. Ahí he conocido otras realidades, una manera diferente de hacer medicina, una auténtica escuela de humanidad. Conoceros ha dado más sentido a aquello a lo que me dedico.

Twapandula!

A lo largo de los años he conocido a varias personas que se han convertido en amigos para toda la vida. Todas ellas han participado de alguna manera de esta tesis y, a riesgo de olvidarme de alguna, me gustaría que sus nombres quedasen por escrito. Gracias a María V., Iván, Terete, José, Nani, Arturo, Santi, María R., Miki, Eva D., Cris, Eli, Eva M., Laura, Miguel. Y especialmente gracias a Ignasi, por ser un amigo incondicional, un hermano; seguro que desde el cielo está celebrando este momento (y muchos otros) con todos nosotros. Y como dice la canción, «and until we meet again, may God hold you in the palm of his hand».

Y por último, gracias a mi familia, una gran familia: mis padres, mis tres hermanos, mis tres cuñados y mis catorce sobrinos (de momento). Ellos me lo han dado todo y de ellos lo he aprendido casi todo. Los amigos los escoge uno, pero la familia te viene dada. Yo puedo decir con orgullo que no podrían haberme dado una mejor. Muchas gracias a todos.

ABREVIATURAS

EC: enfermedad de Chagas.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

DTUs: discrete typing units.

ECG: electrocardiograma.

ELISA: enzimoimmunoanálisis.

ADN: ácido desoxi-ribonucleico.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

ARN: ácido ribonucleico.

YLDs: years lived with disability.

PROSICS: Programa de Salud Internacional del Instituto Catalán de la Salud.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

BSTC: Banco de sangre y tejidos de Cataluña.

ÍNDICE

1 RESUMEN	9
2 INTRODUCCIÓN	11
2.1 INTRODUCCIÓN A LA ENFERMEDAD DE CHAGAS.....	11
2.1.1 <i>Epidemiología de la enfermedad de Chagas</i>	11
2.1.2 <i>Ciclo biológico y patogenia de la EC</i>	13
2.1.3 <i>Presentación clínica de la EC</i>	15
2.1.4 <i>Diagnóstico de la EC</i>	20
2.1.5 <i>Opciones terapéuticas de la EC</i>	22
2.2 INTRODUCCIÓN A LA MODULACIÓN INMUNOLÓGICA POR GEOHELMINTOS.....	25
3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
4 OBJETIVOS	30
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL	30
4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS	30
5 MÉTODOS DEL TRABAJO 1.....	31
5.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO	31
5.2 PROCEDIMIENTOS.....	31
5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
5.4 CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS Y ASPECTOS ÉTICOS	33
6 RESULTADOS DEL TRABAJO 1	34
7 MÉTODOS DEL TRABAJO 2.....	44
7.1 DISEÑO Y POBLACIÓN DEL ESTUDIO	44
7.2 PROCEDIMIENTOS.....	45
7.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45
7.4 CONFIDENCIALIDAD DE LOS DATOS Y ASPECTOS ÉTICOS	46
8 RESULTADOS DEL TRABAJO 2	47
9 DISCUSIÓN	49
10 LIMITACIONES	57
11 CONCLUSIONES	59

12 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....	60
13 BIBLIOGRAFÍA	61

1 RESUMEN

La enfermedad de Chagas es una enfermedad parasitaria endémica en muchas áreas de Latinoamérica, pero debido a los flujos migratorios en las últimas décadas, se ha convertido en una patología frecuente en las consultas especializadas en Medicina Tropical de España. Por otro lado, las geohelminCIAS son parasitosis intestinales ampliamente distribuidas y con una prevalencia elevada en zonas donde la enfermedad de Chagas es endémica. Se sabe que las infecciones por helmintos en humanos pueden modificar la respuesta inmunológica del hospedador frente a otras infecciones o la respuesta frente a vacunas. El objetivo de los dos estudios que componen la presente tesis es evaluar el impacto que tiene la coinfección por helmintiasis intestinales en la presentación clínica y microbiológica de la enfermedad de Chagas en pacientes crónicamente infectados. Una vez realizados los estudios se ha podido concluir que los pacientes con enfermedad de Chagas que presentan una coinfección por un geohelminto (y más específicamente una infección por *Strongyloides stercoralis*) tienen una mayor probabilidad de tener una parasitemia de *Trypanosoma cruzi* detectable (medida por una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real en sangre periférica) que aquellos pacientes sin coinfección.

Chagas disease is a parasitic zoonosis endemic in Latin America. However, due to migrant flows in the last decades, Chagas disease has become a frequent disease in Spanish Tropical Medicine Units. On the other hand, soil-transmitted helminthes are intestinal parasitic diseases broadly distributed and highly prevalent in areas where Chagas disease is endemic. It is known that helminth infection in humans may modify the immune response to other infections or even the antibody production after vaccination. The main objective of the two studies of this thesis is to evaluate the impact of intestinal helminth coinfection on the clinical and microbiological presentation of Chagas disease in chronically infected patients. After performing the studies, it has been concluded that in patients with Chagas disease, the presence of intestinal helminthic coinfection (and specifically the presence of *Strongyloides stercoralis* infection) increases the likelihood of having a detectable *Trypanosoma cruzi* parasitemia (measured by real time polymerase chain reaction in peripheral blood) compared with those patients without coinfection.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Introducción a la enfermedad de Chagas.

2.1.1 Epidemiología de la enfermedad de Chagas.

La enfermedad de Chagas (EC), causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, fue descrita por primera en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas, quien llegó a conocer el agente causal, el vector transmisor, el ciclo biológico, los síntomas y signos clínicos, el método diagnóstico e incluso administró los primeros tratamientos (1). Aunque ya hace más de 100 años que fue descubierta, la EC sigue siendo un problema de salud a nivel mundial y un reto para los profesionales sanitarios. A pesar de todos los esfuerzos por erradicar la enfermedad, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que actualmente hay 6 millones de personas infectadas, y que mueren aproximadamente 10000 personas al año debido a la afectación cardíaca por la EC (2). Originariamente, la EC era una enfermedad endémica en Sudamérica y Centroamérica que afectaba principalmente a población rural y en situación de pobreza. Sin embargo, la progresiva urbanización de esta población y el aumento de la movilidad de ésta hacia otros países no endémicos (especialmente Norteamérica y Europa), han hecho que la EC se convierta en un problema de salud a nivel mundial (3-5).

Actualmente la EC es endémica en 21 países de América continental, desde el sur de los Estados Unidos al norte de Argentina, de los cuales dos terceras partes pertenecen al Cono Sur. Globalmente, el 13% de la población residente en zona endémica se encuentra en riesgo de adquirir la EC. Los países con mayor número de casos estimados de pacientes con EC son Argentina, Brasil, México y Bolivia (2). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, la EC ha cruzado las fronteras internacionales, afectando a países considerados clásicamente no endémicos. Actualmente existe riesgo de

transmisión en estos países (no por vía vectorial), siendo Europa y Estados Unidos las zonas donde se estiman un mayor número de casos, aunque también se han descrito casos en Asia y Oceanía (5-7). Debido a aspectos lingüísticos y culturales, España recibe un porcentaje muy importante de la inmigración procedente de zonas endémicas para EC que se desplaza a Europa, siendo el país europeo con mayor número de personas infectadas, como se refleja en las importantes series de pacientes con EC publicadas (8-11) (Figura 1). Se estima que en España viven aproximadamente 50000-80000 personas con EC. También se ha reflejado en las diversas iniciativas y estrategias que se han implementado en España con el objetivo de controlar la transmisión, como el decreto ley de 2005 que obliga a la realización de cribado de EC en donantes de sangre y tejidos procedentes de área endémica o los programas de prevención de transmisión vertical de algunas Comunidades Autónomas como Cataluña, la Comunidad Valenciana y Galicia (12).

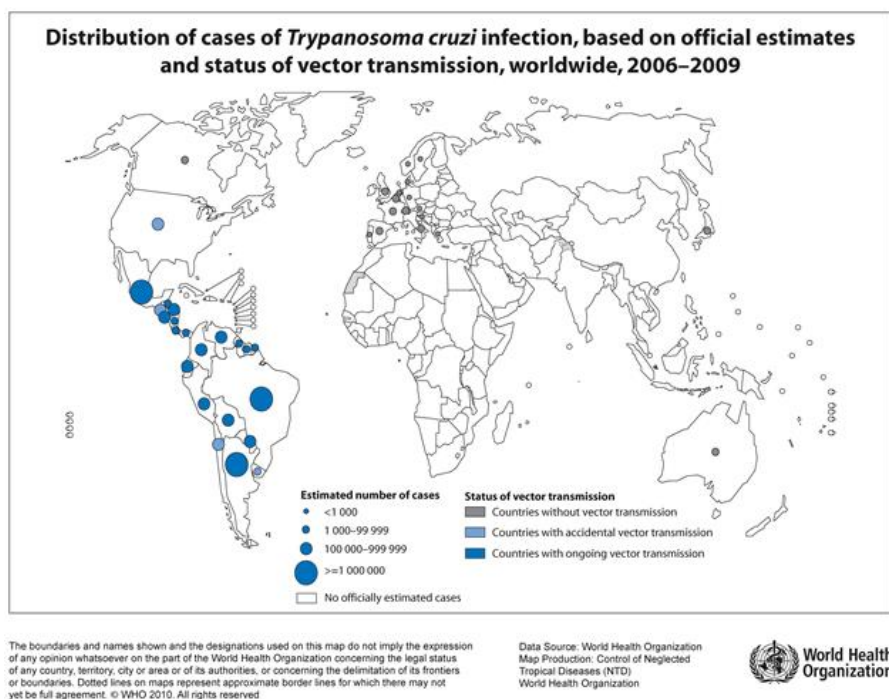


Figura 1. Distribución mundial de la enfermedad de Chagas (Fuente: OMS)

2.1.2 Ciclo biológico y patogenia de la EC.

Como ya se ha comentado, *T. cruzi* es un protozoo hemoflagelado, siendo el reservorio tanto animales domésticos como selváticos. Este parásito es una especie heterogénea, con una diversidad genética muy alta, clasificándose en 6 subespecies (TcI-TcVI) denominadas “discrete typing units” (DTUs), cada una de ellas con una distribución geográfica determinada y con diferencias en cuanto a la presentación clínica y respuesta al tratamiento (13).

La enfermedad se transmite principalmente en zona endémica por vía vectorial a través de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, en concreto por más de 150 especies de triatomos pertenecientes a tres géneros (*Triatoma*, *Panstrongylus* y *Rhodnius*), ampliamente distribuidos por Latinoamérica, que se pueden encontrar tanto en zona selvática como en el área domiciliar (especialmente en casas hechas de adobe) y peridomiciliar (14, 15). Además de la vía vectorial, hay otras vías de transmisión, teniendo muchas de ellas un papel fundamental en la transmisión en zonas no endémicas: transmisión vertical de madre a hijo durante el embarazo, a través de transfusiones de sangre, trasplantes de médula ósea y órganos sólidos, transmisión oral a través de alimentos contaminados y por accidentes de laboratorio (16-20).

El triatomo al alimentarse de sangre de algún mamífero, elimina con las heces la forma tripomastigota metacíclica del *T. cruzi*. Esta puede penetrar la piel a través de pequeñas soluciones de continuidad (muchas veces provocadas por el rascado, ya que las heces del triatomo producen una irritación local) o de mucosas (como la conjuntiva). Dentro del hospedador, el tripomastigote penetra en diversos tipos celulares, transformándose en la forma amastigota del parásito (Figura 2).

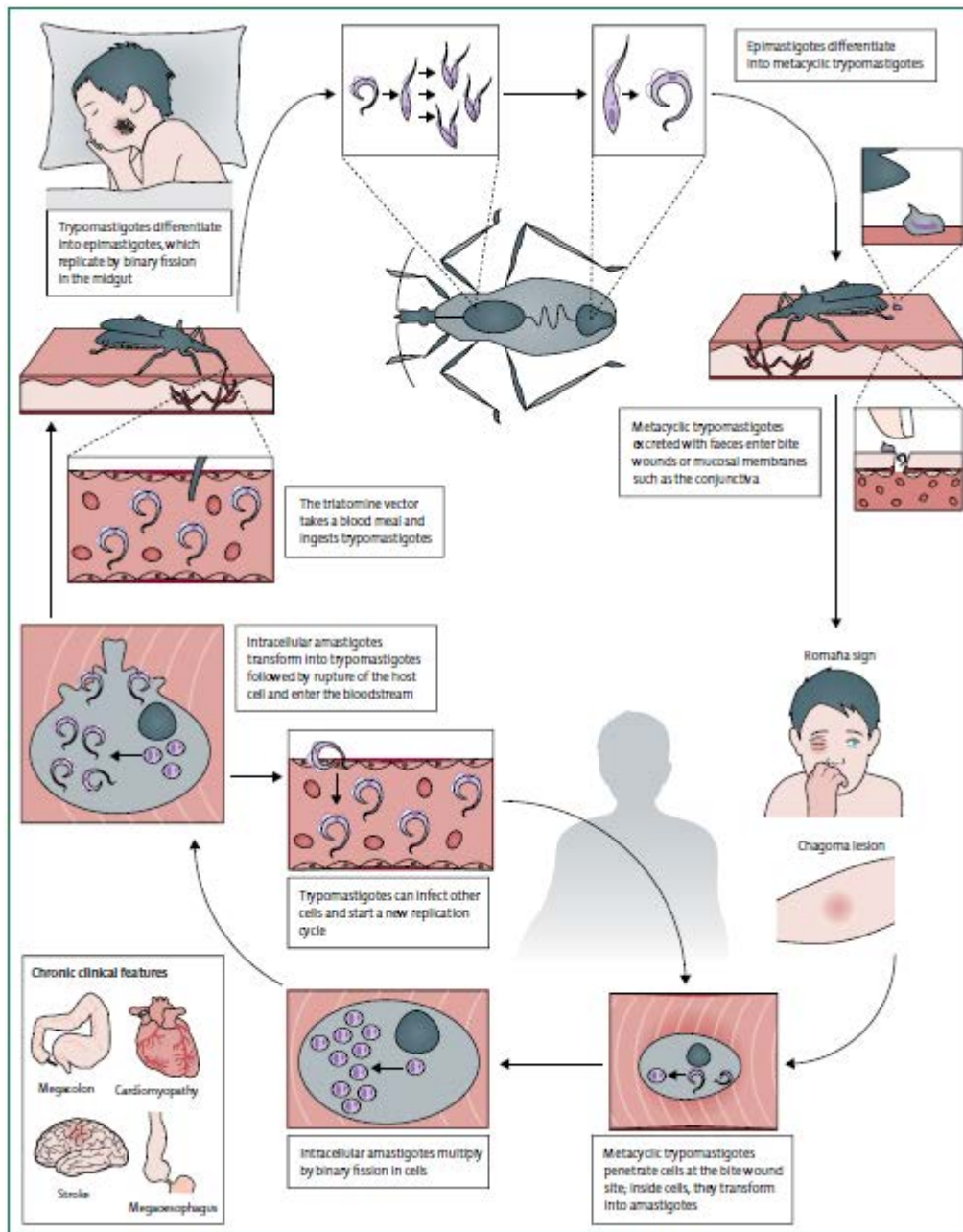


Figura 2. Ciclo vital de *T. cruzi* (Fuente: Pérez-Molina JA et al. Lancet. 2018; 391: 82-94)

El amastigote se multiplica intracelularmente, hasta que la célula es destruida, liberando tripomastigotes que penetrarán en otras células de tejidos adyacentes o se diseminarán por vía hematógica hacia tejidos distantes, donde penetrarán nuevamente en otras

células. El parásito puede invadir cualquier tipo de célula nucleada, pero tiene predilección por aquellas de origen mesenquimal. Los triatomíneos se infectan al alimentarse de sangre de mamíferos infectados (tripomastigotes circulantes). Dentro del intestino medio del insecto se transformarán en epimastigotes (forma exclusiva del vector) y posteriormente emigrarán al intestino posterior, diferenciándose en tripomastigotes metacíclicos, forma infectiva para los mamíferos (4, 21).

En cuanto a la patogenia, hasta hace relativamente poco tiempo, se postulaba que el daño tisular se producía fundamentalmente por producción de autoanticuerpos. Sin embargo, actualmente se sabe que el parásito produce un daño directo sobre el tejido, incluso en la forma crónica de la enfermedad (22, 23). Por tanto, la patogenia de la EC es multifactorial (autoinmune, daño tisular directo por el parásito) y también depende de la DTU (diferente tropismo tisular y virulencia) y el estado inmunológico del hospedador (24). A nivel inmunológico, y especialmente durante la fase aguda de la enfermedad, es fundamental para el control de la infección una respuesta inflamatoria con activación de la producción de anticuerpos y activación de la respuesta inmune innata por citoquinas proinflamatorias Th1 como el factor de necrosis tumoral α y el interferón γ (25, 26).

2.1.3 Presentación clínica de la EC.

La presentación clínica de la EC depende de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente: fase aguda y fase crónica. La fase aguda de la enfermedad pasa desapercibida en la mayor parte de las veces, y cuando aparecen signos y síntomas, éstos aparecen a los 7-10 días tras la infección. Los síntomas de la fase aguda suelen ser inespecíficos, como fiebre y malestar general, pudiendo aparecer adenopatías y

hepatoesplenomegalia. En el lugar de la inoculación puede aparecer una zona de inflamación (chancro de inoculación) o un edema palpebral unilateral cuando el lugar de inoculación es la conjuntiva (signo de Romana). Esta fase aguda finaliza a las 4-8 semanas, cuando la parasitemia disminuye drásticamente, pasando la persona infectada a la fase crónica de la enfermedad (21).

Sin embargo, en aproximadamente un 1-5% de los pacientes, la fase aguda se manifiesta con cuadros clínicos graves, como son la miocarditis, la pericarditis o incluso la afectación del sistema nervioso central en forma de meningoencefalitis, pudiendo llevar a la muerte del paciente (27, 28). Además, cuando la transmisión se produce a través de la ingesta de comida o bebidas (como zumo de açai o de caña de azúcar) contaminadas con heces de triatomíneos, la probabilidad de presentar una manifestación grave de la fase aguda es mayor (18, 29).

Una vez concluida la fase aguda (4-8 semanas tras la infección), se establece la fase crónica de la enfermedad. En la mayoría de los casos, el paciente se mantiene asintomático, sin presentar ningún tipo de afectación visceral (fase crónica indeterminada). Clásicamente se afirma que el 30-40% de los pacientes con infección por *T. cruzi* van a presentar afectación visceral durante la fase crónica de la EC (ya sea afectación cardíaca, digestiva o ambas), y que ésta aparece entre los 10 y los 30 años tras la infección (30). Estos datos están basados en series antiguas procedentes de áreas endémicas; sin embargo, publicaciones recientes realizadas en zonas no endémicas muestran un perfil clínico de pacientes diferente, con población más joven y menor afectación visceral. El porcentaje de afectación visceral también dependerá, de las características del parásito (DTU), características del hospedador y de las técnicas realizadas para evaluar la afectación visceral (8-11, 27, 31-41). (Tablas 1 y 2).

Referencia y año de publicación	Laranja (27), 1956	Coura (31), 1983	Coura (32), 1984	Brenière (33), 1989	Pless (34), 1992	Borges-Pereira (35), 2001	Borges-Pereira (36), 2002	Sánchez-Guillén (37), 2006	Moretti (38), 2010
País	Brasil	Brasil	Brasil	Bolivia	Bolivia	Brasil	Brasil	México	Argentina
Periodo de estudio	1943-1955	1960-1983	1956-1971	1989	1988	1998	2002	2006	2010
Nº de pacientes	1340	510	1070	272	103	270	205	71	405
Edad media (años)	32% por encima de los 40 años	33% por encima de los 40 años	44% por encima de los 40 años	-	40% por encima de los 40 años	62% por encima de los 40 años	87% por encima de los 40 años	39.4	-
Inmunodeprimidos	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Evaluación cardiaca	ECG	ECG, Rx tórax	ECG, Rx tórax	ECG	ECG	ECG	ECG	ECG, Rx tórax, ecocardiograma	ECG
Afectación cardiaca	50.9%	52.1%	40-60%	25.3%	20.3%	24.6%	30.4%	35.2%	29.2%
Evaluación digestiva	-	Esofagograma en todos los pacientes, enema opaco sólo en sintomáticos	Radiografía de la parte anterior derecha del esófago	Enema opaco y radiografía de la parte anterior derecha del esófago	Prueba de tiempo de deglución	-	-	Enema opaco, esofagograma, manometría esofágica	-
Afectación digestiva	-	14.3%	9-10%	35.1%	22%	-	-	21.1%	-

Tabla 1. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con EC de los principales estudios en países endémicos.

Referencia y año de publicación	Muñoz (9), 2009	Lescure (39), 2009	Pérez-Ayala (10), 2011	Valerio (11), 2011	Jackson (40), 2011	Ramos (41), 2012	Salvador (8), 2014
País	España	Francia	España	España	Suiza	España	España
País de procedencia	Bolivia 86.6%	Bolivia 87.4%	Bolivia 97%	Bolivia 93%	Bolivia 93.4%	Bolivia 78.9%	Bolivia 97%
Periodo de estudio	2004-2007	2008-2009	2003-2009	2005-2009	1979-2011	2002-2011	2007-2012
N° de pacientes	202	60	357	100	258	128	1274
Edad media (años)	36	33	36	38.2	41	35	37.7
Evaluación cardíaca	ECG, Rx tórax	Síntomas clínicos	ECG, ecocardiograma	ECG, ecocardiograma	-	ECG, Rx tórax, ecocardiograma	ECG, Rx tórax
Afectación cardíaca	19%	23.6%	18.6%	49%	20.1%	24.1%	16.9%
Evaluación digestiva	Enema opaco y esofagograma solo en sintomáticos	Síntomas clínicos	Enema opaco, esofagograma y manometría esofágica solo en sintomáticos	-	-	Enema opaco y esofagograma solo en sintomáticos	Enema opaco y esofagograma
Afectación digestiva	9%	22%	5.1%	-	0.7%	0.9%	14.8%

Tabla 2. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes con EC de los principales estudios en países no endémicos.

La afectación cardíaca en la fase crónica de la EC es la afectación visceral más frecuente de manera global, y también la que más condiciona el pronóstico del paciente. La frecuencia de la afectación cardíaca varía según las series, pero se estima que afecta a un 15-45% de los pacientes infectados crónicamente. La EC afecta principalmente al sistema de conducción del estímulo eléctrico del corazón y al miocardio (32). Por tanto, las principales manifestaciones de la cardiopatía chagásica serán: las alteraciones de la conducción (bloqueo de rama derecha, hemibloqueo anterior o posterior, bloqueo de rama izquierda, bloqueos aurículo-ventriculares, extrasístoles auriculares y ventriculares, bradicardia, taquicardia ventricular) que producirán síntomas como palpitaciones, síncope o incluso con episodios de muerte súbita, y signos de insuficiencia cardíaca secundaria a miocardiopatía dilatada (42, 43). Habitualmente, antes de que la afectación cardíaca esté establecida, se pueden observar alteraciones electrocardiográficas, por lo que el electrocardiograma (ECG) es una herramienta útil para el cribado de cardiopatía chagásica (44). Otras pruebas de imagen, como el ecocardiograma, muestran alteraciones características como una fracción de eyección disminuida, alteraciones segmentarias de la contractilidad miocárdica o aneurismas apicales (45). Se estima que aproximadamente que cada año un 1.4-5% de los pacientes en fase crónica indeterminada progresan a afectación cardíaca, y que fallecen 10000 personas cada año debido a la afectación cardíaca de la EC (46, 47).

La afectación gastrointestinal es la segunda más frecuente en la EC (10-20%), pudiendo afectar a cualquier tramo del tubo digestivo, siendo las partes más frecuentemente afectadas el colon y el esófago. La afectación digestiva se debe a una pérdida de células del sistema nervioso entérico, dando lugar a trastornos motores y dilataciones (megaesófago y megacolon). Los síntomas más frecuentes son el estreñimiento, dolor abdominal, dispepsia, disfagia y reflujo gastroesofágico (8). Las pruebas más utilizadas

para evaluar la afectación digestiva son las pruebas baritadas (enema opaco y esofagograma), aunque otras pruebas nos pueden dar información sobre la funcionalidad, como la manometría esofágica y ano-rectal (48, 49).

Además, la EC aumenta el riesgo de padecer eventos tromboembólicos, fundamentalmente por la formación de trombos en pacientes con miocardiopatía dilatada o aneurismas apicales (50). Se ha estimado que la incidencia de ictus isquémico de causa cardioembólica en pacientes con EC es de 2.7 casos por 100 pacientes y año (51). Además, la infección por *T. cruzi* per se hace que aumenten determinados factores de hipercoagulabilidad, favoreciendo la formación de trombos (52).

La EC en fase crónica puede reactivarse, especialmente en pacientes con algún tipo de inmunosupresión, presentando los pacientes parasitemias elevadas y manifestaciones clínicas graves como la afectación del sistema nervioso central (meningoencefalitis o absceso cerebral), miocarditis o lesiones cutáneas (paniculitis, nódulos subcutáneos). Estas manifestaciones clínicas graves se han descritos principalmente en pacientes con coinfección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y en los receptores de trasplantes (53, 54).

2.1.4 Diagnóstico de la EC.

El diagnóstico de la EC va a depender fundamentalmente de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente. Cuando la parasitemia es elevada (fase aguda, transmisión congénita o en la reactivación durante la fase crónica) el diagnóstico se realiza mediante técnicas parasitológicas directas en sangre periférica, y excepcionalmente en otros fluidos como el líquido cefalorraquídeo (55). La microscopía directa de sangre periférica permite visualizar el tripomastigote en movimiento,

pudiendo realizarse diferentes tinciones (Giemsa) sobre la extensión periférica o la gota gruesa, con una sensibilidad muy variable entre 34-85%. Diversas técnicas de concentración permiten aumentar la sensibilidad, como son el microhematocrito o el método de Strout. Existen otras técnicas (hemocultivo, xenodiagnóstico) que no se utilizan en la actualidad en la práctica clínica, pero que se usan en laboratorios de investigación (56, 57).

Por el contrario, en la fase crónica de la enfermedad la parasitemia es muy baja e intermitente, por lo que el diagnóstico no se basará en técnicas parasitológicas directas. En la fase crónica de la EC el diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos IgG anti-*T. cruzi* (técnicas serológicas). Estas técnicas pueden ser convencionales (cuando utilizan antígenos tanto del parásito completo como extractos purificados) o no convencionales (antígenos recombinantes o péptidos sintéticos). Las técnicas más utilizadas son la inmunofluorescencia indirecta, la hemaglutinación indirecta y el enzimoimmunoanálisis (ELISA), siendo esta la que alcanza los mejores valores de sensibilidad y especificidad (58). Según los criterios de la OMS, para el diagnóstico de EC en su fase crónica es necesario tener dos técnicas serológicas diferentes positivas (55). En un pequeño porcentaje de veces (alrededor del 3%), se produce una discordancia entre las dos técnicas, en parte debido a posibles reacciones cruzadas con otros protozoos hemoflagelados, como *Leishmania* spp. o *Trypanosoma rangeli*, siendo necesaria la realización de una tercera técnica (59, 60). Por otro lado, en los últimos años se han desarrollado diversas pruebas de diagnóstico rápido que pueden ser útiles en áreas rurales con difícil acceso al sistema sanitario o en estrategias de cribado masivo (61).

En las últimas décadas hemos presenciado un importante desarrollo de las técnicas de detección del ácido desoxi-ribonucleico (ADN) de *T. cruzi* en sangre periférica

mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica puede utilizar diferentes dianas, siendo las más frecuentes la región variable del ADN del minicírculo del kinetoplasto, secuencias repetidas del ADN satélite o genes del ácido ribo-nucleico (ARN) ribosomal (62). En la fase aguda de la EC o en situaciones de reactivación, estas técnicas son de gran utilidad, ya que tienen mayor sensibilidad que las técnicas parasitológicas convencionales (63). Su utilidad como prueba diagnóstica en la fase crónica de la enfermedad es más discutida, ya que sólo es positiva en un 40-70% de las veces dependiendo de los estudios. Sin embargo, se está utilizando cada vez más para monitorizar a los pacientes tras el tratamiento, ya que su positividad indicaría un fracaso del tratamiento. También se utiliza para detectar reactivaciones de la EC de manera precoz en pacientes inmunosuprimidos (54, 64, 65).

2.1.5 Opciones terapéuticas de la EC.

Desde hace más de 40 años, los únicos medicamentos aprobados para la EC son el benznidazol y el nifurtimox. Además, los dos medicamentos tienen una toxicidad nada despreciable y su eficacia va a depender de la fase de la enfermedad en la que se encuentre el paciente y del área geográfica (varía según la DTU) (66).

Debido a su mejor perfil de seguridad y a la experiencia acumulada de su uso, el benznidazol es actualmente el tratamiento de primera elección. Aún así, su toxicidad lleva a la retirada del fármaco en un 7-30% de los pacientes. La dosis utilizada es la de 5mg/Kg/día repartido en 2-3 tomas durante 60 días. Los efectos adversos más frecuentes son: reacciones de hipersensibilidad y toxicodermia (los más frecuentes, se observan hasta en un 50% de los pacientes, y los que suelen condicionar la suspensión

del tratamiento), alteraciones gastrointestinales, cefalea, artromialgias, y más raramente alteraciones del perfil hepático y neuropatía periférica (67).

En la fase aguda de la enfermedad se consiguen tasas de curación elevadas, entre el 65-85%; esta tasa es más elevada en los casos de transmisión congénita, llegando a 95% (68). Sin embargo, la tasa de curación en la fase crónica disminuye drásticamente, consiguiéndose únicamente en el 15-40% de los casos. Además, el criterio actual para definir la curación es la negativización de la serología, lo que en la fase crónica de la EC puede ocurrir a los 20 años después de haber realizado el tratamiento, dificultando mucho el seguimiento de estos pacientes (69). Hasta hace poco, se recomendaba ofrecer tratamiento a todos los pacientes en fase crónica, recomendación basada en la mejor evolución clínica observada en los pacientes tratados con benznidazol; sin embargo, ensayos clínicos recientes no muestran diferencias en la evolución clínica en pacientes con EC con afectación cardíaca tratados con benznidazol o placebo (65, 70, 71).

Con toda esta evidencia, se recomienda ofrecer siempre tratamiento en la fase aguda, en la EC congénita, en situaciones de reactivación, en la fase crónica en niños y menores de 18 años, y en mujeres en edad fértil (para evitar la transmisión vertical). Aunque no hay tanta evidencia, se suele ofrecer en personas con EC en fase crónica sin afectación cardíaca establecida por debajo de los 55 años (55).

Por tanto, se hace necesario la búsqueda de nuevos medicamentos más eficaces y con mejor perfil de seguridad. Dentro de los actuales candidatos, los que han arrojado mejores resultados en los estudios preclínicos son los inhibidores de la síntesis del ergosterol. Sin embargo, los primeros ensayos clínicos realizados en pacientes con EC en fase crónica con estos compuestos (posaconazol y pro-ravuconazol) no han mostrado los resultados esperados, ya que mostraron una supresión mantenida de la parasitemia

durante el tiempo de tratamiento, pero un alto porcentaje de los pacientes volvía a tener parasitemia detectable al suspender el medicamento (64, 72, 73).

2.2 Introducción a la modulación inmunológica por geohelminetos.

Las helmintiasis intestinales, y especialmente los geohelminetos (uncinarias, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*, *Strongyloides stercoralis*) son parasitosis ampliamente distribuidas por áreas tropicales y subtropicales, especialmente de África, Latinoamérica, Sudeste asiático y China. Su presencia está claramente relacionada con una infraestructura sanitaria limitada y unas condiciones higiénicas deficientes (especialmente con una mala gestión de las aguas residuales), es decir, con la pobreza (74). Se estima que más de 1500 millones de personas están infectadas, lo que corresponde a un 24% de la población mundial. Aunque la mortalidad no es elevada, estas infecciones sí que producen una elevada morbilidad, especialmente en niños en edad escolar y preescolar, secundaria al retraso del crecimiento, déficit nutricional, anemia y retraso cognitivo. Se estima que los geohelminetos ocasionan 4.98 millones de YLDs (del inglés “years lived with disability”) anualmente (75).

La OMS recomienda diferentes estrategias para el control de las geohelmintiasis, como la administración masiva de medicamentos (con albendazol y mebendazol), la educación y las mejoras en el manejo de los residuos (74). Estas estrategias están focalizadas fundamentalmente al control de las uncinarias, *A. lumbricoides* y *T. trichiura*, pero no son efectivas para el *S. stercoralis* (76). A pesar de que la prevalencia de la estrongiloidiasis a nivel mundial es menor que la de las otras geohelmintiasis (80-100 millones de personas), este helminto tiene dos características que lo hacen particularmente interesante: la capacidad de permanecer en el hospedador durante muchos años después de abandonar una zona endémica (por la capacidad de autoinfección) y la posibilidad de producir cuadros clínicos graves (síndrome de hiperinfestación y estrongiloidiasis diseminada) (77).

Los helmintos tienen la capacidad de modular la respuesta inmune de sus hospedadores, permitiendo que el parásito pueda persistir durante largos periodos de tiempo. Los diversos periodos de convivencia con los hospedadores a lo largo de la historia, las estrategias de transmisión y los nichos fisiológicos reflejan la variedad de actividades inmunomoduladoras observadas en las tres categorías taxonómicas (nematodos, cestodos y trematodos). Sin embargo, como regla general, todos ellos producen una respuesta inmunológica Th2 (con liberación de citoquinas como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, activación y proliferación de células B, liberación de inmunoglobulinas y activación y producción de eosinófilos), a la vez que suprimen la respuesta Th1 y Th17 (78-80).

Esta modulación de la respuesta inmune del hospedador por parte de los helmintos puede modificar la respuesta inmune frente a otras infecciones o incluso modificar la producción de anticuerpos tras una vacunación, habiendo múltiples ejemplos en la literatura. Uno de los efectos que se ha observado, es que los pacientes con infecciones helmínticas que presentan una sepsis (generalmente por bacterias Gram negativas) tienen una mejor supervivencia que los pacientes sin coinfección helmíntica, debido a una modulación de la respuesta pro-inflamatoria que se produce en la sepsis (81).

También hay ejemplos de modulación inmunológica por helmintos en pacientes con tuberculosis. En un estudio realizado en Etiopía, en pacientes con y sin enfermedad tuberculosa, la prevalencia de helmintiasis intestinales fue del 71% en pacientes con tuberculosis y de 36% en los convivientes sanos, arrojando una “odds ratio” de 4.7 (82). En otro estudio realizado en la misma zona de Etiopía, mostró como los pacientes con tuberculosis que tenían una coinfección por un helminto tenían una menor proporción de baciloscopia positiva en esputo comparado con los que no estaban coinfectados (83). Esto ocurre también en otras situaciones donde hay una polarización hacia una respuesta inmune tipo Th2, como ocurre en los pacientes infectados por el VIH. Además, otro

estudio mostró como la eficacia de la vacunación con bacilo de Calmette-Guérin es menor en niños con coinfecciones por helmintos comparado con los no coinfectados (84).

Otros ejemplos del efecto inmunomodulador de los helmintos se ha descrito en pacientes con infección por el VIH residentes en áreas tropicales. Hay estudios que describen que la presencia de helmintiasis intestinales (en concreto uncinarias) en personas con infección por el VIH produce una disminución en la cifras de linfocitos T CD4+, así como incrementos en la carga viral (85). Por otro lado, pacientes que reciben tratamiento con albendazol para tratar una infección por *A. lumbricoides*, presentan un aumento en el número de linfocitos T CD4+, incluso en ausencia de tratamiento antirretroviral (86).

También encontramos ejemplos de cómo puede afectar la coinfección helmíntica en situaciones de infección por otro parásito, como la malaria. Un estudio realizado en 5 aldeas de la frontera occidental de Tailandia, mostró como los habitantes con infección por geohelmintos presentaban una mayor probabilidad de presentar una malaria por *Plasmodium falciparum* comparado con los habitantes no coinfectados, con un riesgo relativo de 2.24. Además, el riesgo aumentaba de manera proporcional al número de especies de helmintos diferentes que presentaba la persona. (87)

Como se ha comentado, la infección por un helminto no sólo puede afectar a la respuesta frente a otra infección, si no que puede afectar a la respuesta inmunológica a una vacuna, alterando la producción de anticuerpos. Un estudio realizado en Gabón para evaluar un nuevo candidato para vacuna antimalárica en niños de edad preescolar observó que los niños que presentaban una infección por *T. trichiura* tenían una concentración de anticuerpos vacunales significativamente menor que los niños que no

presentaban dicha infección, así como una respuesta de linfocitos B de memoria disminuida. Teniendo en cuenta estos hallazgos, los posibles futuros programas de vacunación contra la malaria deberán tener en cuenta la prevalencia de infección por geohelminths en las áreas de aplicación (88).

3 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO Y HIPÓTESIS DE TRABAJO

Por tanto, las helmintiasis intestinales, especialmente los geohelminetos, son infecciones altamente prevalentes y distribuidas principalmente por áreas tropicales y subtropicales. A pesar de que no confieren una elevada mortalidad, sí que producen una morbilidad muy importante, especialmente en edades pediátricas. Además, las infecciones por geohelminetos pueden modificar la respuesta inmune del hospedador frente a otras infecciones o modificar la respuesta inmunológica frente a una vacuna. Esto condiciona que en situaciones de coinfección, la presentación clínica y los hallazgos microbiológicos de determinadas infecciones puedan ser diferentes a las habituales.

Por otro lado, durante las últimas décadas la EC ha pasado de ser una enfermedad exclusiva de zonas rurales y empobrecidas de Latinoamérica a ser una enfermedad urbana y llegar a zonas consideradas clásicamente no endémicas. España recibe un gran volumen de inmigrantes procedentes de Latinoamérica, siendo el segundo país no endémico con mayor número de casos de EC tras los Estados Unidos. Estos pacientes que recibe España proceden de áreas donde también son muy prevalentes las infecciones por geohelminetos, siendo la coinfección helminto-EC frecuente en este tipo de pacientes.

Los pacientes con EC que presentan una coinfección por un geohelminto podrían tener una modificación de su respuesta inmune frente a la primera, con posibilidad de modificarse su expresión clínica o presentar cambios en los hallazgos microbiológicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Evaluar el impacto de la coinfección por helmintos intestinales en la presentación clínica y las características microbiológicas de los pacientes con EC en fase crónica o indeterminada.

4.2 Objetivos secundarios

- Determinar la prevalencia de infección por helmintos intestinales en pacientes con EC en fase crónica o indeterminada.
- Evaluar el impacto de la infección por helmintos intestinales en la presentación clínica (afectación cardíaca y digestiva) de los pacientes con EC en fase crónica o indeterminada.
- Evaluar el impacto de la infección por helmintos intestinales en las características microbiológicas (detección de ADN de *T. cruzi* mediante PCR en sangre periférica) de los pacientes con EC en fase crónica o indeterminada.

5 MÉTODOS DEL TRABAJO 1

5.1 Diseño y población del estudio

El primer trabajo se trata de un estudio prospectivo observacional realizado en la Unidad de Medicina Tropical (Servicio de Enfermedades Infecciosas) del Hospital Universitario Vall d'Hebron, incluida en el Programa de Salud Internacional del Instituto Catalán de la Salud (PROSICS), durante el periodo de marzo de 2014 a febrero de 2015.

Los criterios de inclusión fueron:

- Edad igual o superior a 18 años.
- Diagnóstico de EC en su fase crónica o indeterminada.
- Firma del consentimiento informado.

Los criterios de exclusión fueron:

- Tratamiento previo para la EC o para infecciones por helmintos.
- Embarazo.
- Cualquier tipo de inmunosupresión.

5.2 Procedimientos

El diagnóstico de EC se realizó mediante la positividad de dos técnicas serológicas diferentes siguiendo las recomendaciones actuales de la OMS (55): un ELISA con antígeno recombinante (Bioelisa Chagas, Biokit, Lliçà d'Amunt, Spain), y un ELISA con antígeno nativo (Ortho *T.cruzi* ELISA, Johnson & Johnson, High Wycombe, United Kingdom).

Se realizó una evaluación cardíaca en todos los pacientes mediante un cuestionario estructurado de síntomas, exploración física, un electrocardiograma de 12 derivaciones y una radiografía de tórax. La afectación cardíaca de los pacientes se clasificó siguiendo la escala de Kushnir, descrita en la Tabla 3 (89). La evaluación digestiva se realizó mediante un cuestionario de síntomas, exploración física y un enema opaco. Siguiendo los criterios de Ximenes, se definió como enema opaco patológico aquel que mostraba un dolico colon o un diámetro sigmoideo superior a 6cm (90).

Estadios	Definición
Estadio 0	Electrocardiograma normal, radiografía tórax normal, asintomático
Estadio 1	Electrocardiograma alterado, radiografía tórax normal, asintomático
Estadio 2	Cardiomegalia en la radiografía tórax, asintomático
Estadio 3	Síntomas compatibles con insuficiencia cardíaca

Tabla 3. Escala de afectación cardíaca de Kushnir.

También se realizó una reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (RT-PCR) para detectar ADN de *T. cruzi* en una muestra de sangre periférica, siguiendo el protocolo descrito por Piron et al (91).

Para el diagnóstico de infección helmíntica, se realizaron las siguientes pruebas en todos los pacientes: hemograma convencional para detectar la presencia de eosinofilia (definida como un recuento de eosinófilos ≥ 500 células/mm³ y/o $\geq 7\%$), examen microscópico de tres muestras de heces recogidas en días diferentes tras concentración mediante la técnica de formol-éter de Ritchie, cultivo fecal específico para detección de larvas de *S. stercoralis* (con carbón vegetal), detección de IgG anti-*S. stercoralis* en suero mediante una técnica ELISA (SciMedx Corporation, Denville, NJ, United States). La definición de infección helmíntica incluyó: infección confirmada (mediante la

visualización directa de huevos o larvas de helmintos), e infección probable (presencia de eosinofilia y una serología positiva para *S. stercoralis* en ausencia de otra causa de eosinofilia).

5.3 Análisis estadístico

Las variables cualitativas se presentaron como números absolutos y proporciones, mientras que las variables cuantitativas se presentaron como medianas y rangos. El test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher se utilizaron para comparar la distribución de variables cualitativas, y el test de la U de Mann-Whitney para comparar la distribución de variables cuantitativas. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p era inferior a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics (Versión 19.0; SPSS Inc, Chicago, IL, United States).

5.4 Confidencialidad de los datos y aspectos éticos

La recogida de datos se hizo con unos protocolos previamente establecidos y los datos se introdujeron en una base de datos con un sistema de codificación con el fin de proteger la información personal de cada paciente. En la hoja de recogida de datos el código se relacionó con el número de historia clínica. Estas hojas son custodiadas por el investigador responsable. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en el estudio. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo con los requerimientos éticos establecidos en la Declaración de Helsinki revisada en 2013.

6 RESULTADOS DEL TRABAJO 1

Título: Impacto de la infección por helmintos en la presentación clínica y microbiológica de pacientes con enfermedad de Chagas en fase crónica.

Autores: Fernando Salvador¹, Elena Sulleiro², Adrián Sánchez-Montalvá¹, Mónica Martínez-Gallo³, Eugenia Carrillo⁴ e Israel Molina¹

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, España.

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, PROSICS Barcelona, Barcelona, España.

³Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España.

⁴Centro colaborador de la OMS para Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España.

Antecedentes: Las infecciones por helmintos son muy prevalentes en áreas tropicales y subtropicales, coexistiendo en áreas endémicas para la EC. Las infecciones helmínticas en humanos pueden modular el sistema inmunológico del hospedador, cambiando la polarización Th1/Th2. Esta alteración inmunológica podría modificar la respuesta inmunológica a otras infecciones. El objetivo de este estudio es evaluar la relación entre las características clínicas, microbiológicas y epidemiológicas en pacientes con EC con la presencia de infección por helmintos.

Métodos: Estudio prospectivo observacional realizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España). Los criterios de inclusión fueron: edad superior a 18

años, diagnóstico de EC, y no haber realizado tratamiento específico para la EC previamente a la inclusión. El protocolo de estudio incluía una evaluación de la EC (evaluación cardíaca y digestiva, detección de ADN de *T. cruzi* medido por RT-PCR en sangre periférica) y diagnóstico de infección por helmintos (examen microscópico de muestras de heces de 3 diferentes días, cultivo específico de heces para larvas de *S. stercoralis*, y detección de IgG anti-*S. stercoralis* mediante una técnica ELISA).

Resultados: Se incluyeron 65 pacientes, 75,4% eran mujeres, con una mediana de edad de 38 años, y la mayoría procedían de Bolivia. Se observó afectación cardíaca y digestiva en el 18,5% y 27,7% de los pacientes respectivamente. La RT-PCR de *T. cruzi* fue positiva en 28 (43,1%) pacientes. Se diagnosticó infección helmíntica en 12 (18,5%) pacientes (11 de ellos con infección por *S. stercoralis*). No se observaron diferencias en las características clínicas y epidemiológicas entre los pacientes con y sin infección helmíntica. Sin embargo, la proporción de pacientes con una RT-PCR de *T. cruzi* fue mayor entre los pacientes con infección helmíntica comparado con los pacientes sin infección helmíntica (75% versus 35,8%, $p=0,021$).

Conclusiones: Observamos una alta prevalencia de infección por *S. stercoralis* entre los pacientes con EC atendidos en nuestra Unidad de Medicina Tropical. La estrongiloidiasis se asoció de manera significativa a una mayor proporción de RT-PCR de *T. cruzi* positiva detectada en sangre periférica.

Trabajo publicado en: PLoS Neglected Tropical Diseases. 2016; 10(4): e0004663.

RESEARCH ARTICLE

Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients

Fernando Salvador^{1*}, Elena Sulleiro², Adrián Sánchez-Montalvá¹, Mónica Martínez-Gallo³, Eugenia Carrillo⁴, Israel Molina¹

1 Department of Infectious Diseases, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain, **2** Department of Microbiology, Vall d'Hebron University Hospital, PROSICS Barcelona, Barcelona, Spain, **3** Immunology Division, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain, **4** WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

* fmsalvad@vhebron.net



click for updates

 OPEN ACCESS

Citation: Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Martínez-Gallo M, Carrillo E, Molina I (2016) Impact of Helminth Infection on the Clinical and Microbiological Presentation of Chagas Diseases in Chronically Infected Patients. *PLoS Negl Trop Dis* 10(4): e0004663. doi:10.1371/journal.pntd.0004663

Editor: Michael H. Hsieh, George Washington University, UNITED STATES

Received: February 8, 2016

Accepted: April 5, 2016

Published: April 26, 2016

Copyright: © 2016 Salvador et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors. This study was supported by the 6th National Plan (PN) of Research + Development + Innovation (I+D+I) 2008-2011, ISCIII-General Division Networks and Cooperative Research Centres + FEDER funds + Collaborative Research Network on Tropical Diseases (RICET): RD12/0018/0020 and RD12/0018/0011. The funders had no role in study design, data collection and

Abstract

Background

Helminth infections are highly prevalent in tropical and subtropical countries, coexisting in Chagas disease endemic areas. Helminth infections in humans may modulate the host immune system, changing the Th1/Th2 polarization. This immunological disturbance could modify the immune response to other infections. The aim of this study is to evaluate the relationship between clinical, microbiological and epidemiological characteristics of Chagas disease patients, with the presence of helminth infection.

Methods

A prospective observational study was conducted at Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain). Inclusion criteria were: age over 18 years, diagnosis of Chagas disease, and not having received specific treatment for Chagas disease previously to the inclusion. The study protocol included Chagas disease assessment (cardiac and digestive evaluation, detection of *T. cruzi* DNA measured by PCR in peripheral blood), and helminth infection diagnosis (detection of IgG anti-*Strongyloides stercoralis* by ELISA, microscopic examination of stool samples from three different days, and specific faecal culture for *S. stercoralis* larvae).

Results

Overall, 65 patients were included, median age was 38 years, 75.4% were women and most of them came from Bolivia. Cardiac and digestive involvement was present in 18.5% and 27.7% of patients respectively. *T. cruzi* PCR was positive in 28 (43.1%) patients. Helminth infection was diagnosed in 12 (18.5%) patients. No differences were observed in clinical and epidemiological characteristics between patients with and without helminth infection. Nevertheless, the proportion of patients with positive *T. cruzi* PCR was higher

analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

among patients with helminth infection compared with patients without helminth infection (75% vs 35.8%, $p = 0.021$).

Conclusions

We observed a high prevalence of *S. stercoralis* infection among chronic Chagas disease patients attended in our tropical medicine unit. Strongyloidiasis was associated with significantly higher proportion of positive *T. cruzi* RT-PCR determined in peripheral blood.

Author Summary

Helminth infections (viz. *Strongyloides stercoralis*, hookworms, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*) are highly prevalent in tropical and subtropical areas, and some of these infections may persist in the human host for many years after leaving the endemic area. It is known that helminth infection in humans may modulate the host immune system. This immunological disturbance could modify the immune response to other infections or the antibody production after vaccination. We prospectively studied a group of patients with chronic Chagas disease, with the aim of evaluate the impact of helminth co-infection in the clinical manifestations and microbiological features of Chagas disease. We observed a high prevalence of helminth infection (mostly due to *S. stercoralis* infection) among chronic Chagas disease patients attended in our tropical medicine unit. Strongyloidiasis was associated with significantly higher proportion of positive *T. cruzi* RT-PCR determined in peripheral blood. These data increase the scarce available information to understand the role of PCR techniques in the management of Chagas disease patients. Further studies are needed to deepen and confirm this interesting relationship.

Introduction

Chagas disease is a parasitic infection caused by the hemoflagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease is an endemic disease of Latin America affecting rural and poor population; nevertheless, progressive urbanization and the increase of population mobility during last decades, have made Chagas disease an urban and global disease outside endemic countries: mainly in United States and Spain [1, 2].

After the acute phase of the infection, a subsequent usually asymptomatic chronic stage (or indeterminate phase) takes place during years; after 20–30 years, up to a 30–40% of patients will develop the symptomatic chronic phase, with cardiac and/or digestive involvement [2]. Chagas disease diagnosis in the chronic phase is based on serological tests. Due to the low parasitaemia in this phase, classical direct parasitological tests (microhematocrit, hemoculture, xenodiagnose) are usually negative [3]. Nevertheless, more sensitive tests such as the polymerase chain reaction (PCR) have being developed [4]. The percentage of positive *T. cruzi* PCR in peripheral blood in patients with Chagas disease in the chronic phase highly varies depending on the study: it ranges from 80% to 90% in studies performed in endemic countries, and is lower in non-endemic countries, ranging from 28% to 66% [5–10]. *T. cruzi* PCR is not routinely performed in the management of chronic Chagas disease patients, but is becoming very useful in specific situations, such as follow-up in immunosuppressed patients in order to detect reactivation or in clinical trials to detect treatment failures [11–13]. However the role of the *T. cruzi* PCR in the chronic phase of Chagas disease needs to be defined.

Helminth infections (viz. *Strongyloides stercoralis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*) are highly prevalent in tropical and subtropical areas, coexisting in Chagas disease endemic areas, and some of these infections may persist in the human host for many years after leaving the endemic area [14]. It is known that helminth infection in humans may modulate the host immune system, changing the Th1/Th2 polarization. This immunological disturbance could modify the immune response to other infections or the antibody production after vaccination [15, 16].

The aim of the present study is to evaluate the relationship between clinical and epidemiological characteristics of chronic Chagas disease patients, with the presence of helminth infection.

Materials and Methods

Ethics statement

The study protocol was approved by the Ethical Review Board of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona, Spain), and written informed consent was obtained from all patients. Procedures were performed in accordance with the ethical standards laid down in the Declaration of Helsinki as revised in 2000.

Study protocol

This is a prospective observational study performed at the Infectious Diseases Department of the Vall d'Hebron University Hospital, a tertiary hospital included in the International Health Program of the Catalan Health Institute (PROSICS Barcelona, Spain), from March 2014 to February 2015. All adults (over 18 years old) with recently diagnosis of Chagas disease in the chronic or indeterminate form attended during the study period were offered to participate. Exclusion criteria included: previous treatment for Chagas disease or helminth infections, pregnancy or immunosuppression.

Diagnosis of Chagas disease was performed through two positive different serological tests according to WHO recommendations [17]: an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with recombinant antigen (Bioelisa Chagas, Biokit, Lliçà d'Amunt, Spain), and an ELISA with crude antigen (Ortho *T. cruzi* ELISA, Johnson & Johnson, High Wycombe, United Kingdom). Cardiac and digestive involvement was assessed through a clinical symptoms questionnaire, physical examination, 12-lead electrocardiography, chest radiography, and barium enema. Patients were stratified according to the clinical Kuschnir classification for cardiac involvement assessment [18]. Pathologic barium enema was defined by dolichocolon or sigmoid diameter > 6cm (megacolon) [19]. A real time PCR (RT-PCR) to detect *T. cruzi* DNA in peripheral blood was performed in all patients according to the method described by Piron *et al* [20].

For helminth infection diagnosis, microscopic examination of stool samples from three different days after concentration techniques using Ritchie's formalin-ether technique were performed in all patients. A faecal culture for *S. stercoralis* larvae detection (charcoal culture) was also performed. Moreover, blood cell count to detect presence of eosinophilia (defined as ≥ 500 cells/mm³ and/or $\geq 7\%$), and detection of serum IgG anti-*S. stercoralis* by ELISA (SciMedx Corporation, Denville, NJ, United States) were conducted.

Definition of helminth infection included: confirmed infections through direct observation, and probable infection (presence of eosinophilia and positive *S. stercoralis* serology in the absence of other causes of eosinophilia).

Statistical analysis

Categorical data are presented as absolute numbers and proportions, and continuous variables are expressed as medians and ranges. The χ^2 test or Fisher exact test, when appropriate, was used to compare the distribution of categorical variables, and the Mann-Whitney U test for continuous variables. Results were considered statistically significant if the 2-tailed P value was <0.05. SPSS software for Windows (Version 19.0; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) was used for statistical analyses.

Results

Overall, 72 patients were included during the study period. Six patients were excluded because they did not complete the study protocol; therefore, 66 patients were analyzed. The median age of patients was 38 (18–67) years, and 50 (75.8%) were women. The vast majority came from Bolivia (64 patients, 97%) and, at the time of the first visit, the median duration of residence in our country was 9 (1–14) years, and 41 (62.1%) patients had traveled again to their countries after arriving to Spain (most of them spent less than 2 months in their countries, and stayed in an urban setting). Cardiac involvement was diagnosed in 12 (18.2%) patients (nine patients in the stage I, and three patients in the stage II of the Kushnir classification respectively). Eighteen (27.3%) patients presented abnormalities in the barium enema: 16 patients with dolichocolon, and 2 patients with megacolon. At the time of Chagas disease diagnosis, *T. cruzi* RT-PCR in peripheral blood was positive in 28 (42.4%) patients.

Helminth infection was diagnosed in 12 (18.2%) patients: two patients with confirmed infection (one patient with *S. stercoralis* and another patient with *Hymenolepis nana*), and 10 patients with probable infection. Patients with helminth infection had a median eosinophil cell count of 500 (100–1200) cells/mm³. Table 1 shows other protozoan parasites observed in the microscopic examination of stool samples. When comparing main clinical and epidemiological characteristics between patients with and without helminth infection, no differences were observed (Table 2). Nevertheless, the percentage of patients with positive *T. cruzi* RT-PCR was higher in patients with helminth infection compared with those without helminth infection (75% versus 35.2%, p = 0.021).

Discussion

We prospectively studied 66 adult patients with Chagas disease to evaluate the relationship between microbiological, clinical and epidemiological characteristics with the presence of

Table 1. Protozoan parasites observed in stool samples of Chagas disease patients.

Parasites isolated	Number of patients (n = 66)
Parasites of uncertain significance	
<i>Blastocystis hominis</i>	23 (34.8%)
<i>Dientamoeba fragilis</i>	7 (10.6%)
Non pathogenic	
<i>Entamoeba coli</i>	6 (9.1%)
<i>Entamoeba sp</i>	3 (4.5%)
<i>Iodamoeba butschlii</i>	3 (4.5%)
<i>Endolimax nana</i>	2 (3%)

NOTE. Data are reported as number (%) of patients.

doi:10.1371/journal.pntd.0004663.t001

Table 2. Main clinical and epidemiological characteristics of Chagas disease patients visited at Vall d'Hebron University Hospital from March 2014 to February 2015.

	Overall (n = 66)	Patients with helminth infection (n = 12)	Patients without helminth infection (n = 54)	P value
Age, years	38 (18–67)	41 (28–65)	38 (18–67)	0.247
Gender, male	16 (24.2%)	5 (41.7%)	11 (20.4%)	0.145
Time of residence in our country, years	9 (1–14)	9.5 (1–14)	9 (1–14)	0.967
Cardiac involvement	12 (18.2%)	3 (25%)	9 (16.7%)	0.376
Digestive involvement	18 (27.3%)	3 (25%)	15 (27.8%)	1
Positive <i>T. cruzi</i> RT-PCR	28 (42.4%)	9 (75%)	19 (35.2%)	0.021

NOTE. Data are reported as number (%) of patients or median (range).

doi:10.1371/journal.pntd.0004663.t002

helminth infection. Positive *T. cruzi* RT-PCR was more frequent in patients with helminth infection compared with those without helminth infection.

Although the study was carried out in a limited group of Chagas disease patients, clinical and epidemiological characteristics found in the study population were similar to those found in larger studies performed in non-endemic countries: most of them coming from Bolivia, young people, majority of women, and low prevalence of cardiac and digestive involvement [2, 8–10]. Therefore, our study population is representative of the Chagas disease population diagnosed and treated in non-endemic areas.

Helminth infection has been diagnosed in 18.2% of the study population, being strongyloidiasis the most frequent infection (all except from one). The *S. stercoralis* infection predominance was rather expected, since the median time of residence in Spain in our population was 9 years, thus decreasing the probability of other helminth infections such as *Ascaris lumbricoides*, hookworms or *Trichuris trichiura*. *S. stercoralis* is distributed worldwide, being more frequent in tropical and subtropical areas. High prevalence has been found in Latin American countries where Chagas disease is also endemic, hence co-infection is supposed to be high in this area [21]. Scarce information about the prevalence of strongyloidiasis in Bolivia is available, and it is centered in at risk groups [22]. A study published by Ramos *et al* showed a *S. stercoralis* seroprevalence of 44.4% among Bolivian immigrants living in Spain [23]. Although our study was not focused on intestinal protozoa, it is important to note the high prevalence of *Blastocystis hominis* and *Dientamoeba fragilis* infections (34.8% and 10.6% respectively) observed in our study population; despite their pathogenicity remains uncertain and controversial, the presence of these parasites may be used as a marker of potential exposure to other pathogenic parasites.

When comparing epidemiological, clinical and microbiological characteristics between patients with and without helminth infection, the first group had statistically significant higher proportion of positive *T. cruzi* RT-PCR in peripheral blood than the second group (75% and 35.2% respectively). To our knowledge, no previous study has addressed the possible implications of Chagas disease and helminth co-infection in humans. Nevertheless, some interesting studies in animal model have been published with similar findings. Monteiro *et al* described higher prevalence of *T. cruzi*-positive blood cultures in golden lion tamarins infected with *T. cruzi* when they were co-infected with intestinal helminths of the Trichostrongylidae family, which is coherent with the results obtained in our study [24]. Another study performed with *T. cruzi* infected mice went in depth in this relationship between helminth infection and *T. cruzi* parasitaemia: no differences in the parasitaemia were found between non co-infected and early co-infected mice (the *T. cruzi* infection took place 2–4 weeks after *Taenia crassiceps* infection),

however, late co-infected mice (the *T. cruzi* infection took place 8–12 weeks after *Taenia crassiceps* infection, when a predominant Th2-type cytokine response is expected) showed significantly higher parasitaemia compared with non co-infected and early co-infected mice [25].

Strongyloides spp infection in the murine model induces a Th2 response and regulatory cytokine induction (IL-10), leading to a suppression of pro-inflammatory cytokines and diminishing Th1 response [26]. These pro-inflammatory cytokines (Th1 response) are present in the acute phase of Chagas disease [27]. Thus, co-infection with different parasites may result in complex interactions, which may lead to altered immunological responses of the host.

The relationship between positive *T. cruzi* RT-PCR in peripheral blood and helminth infection (mostly strongyloidiasis) found in this study provides highly relevant data to better understand the role of the PCR in the management of Chagas disease patients. Helminth infection could increase the probability of having a positive *T. cruzi* PCR. Given that current clinical trials that evaluate treatment efficacy in Chagas disease are based on the positivity of *T. cruzi* PCR, this fact may be relevant. [13, 28]. Further studies are needed to evaluate the impact of treating the helminth infection on the positivity of *T. cruzi* PCR.

Another issue that has to be taken into account is that almost all patients in our study came from Bolivia. The geographical distribution of the different *T. cruzi* discrete typing units (DTUs) differs from country to country, which may have impact in the clinical presentation or in the proportion of patients with positive *T. cruzi* PCR in peripheral blood [29].

This study has some limitations. First of all, as we have mentioned previously, the study has been performed with a relatively small number of patients; nevertheless, the study population is representative of Chagas disease patients attended in Spanish tropical medicine units. Secondly, the diagnosis of strongyloidiasis has relied in serological tests in most of the cases. Although serology is not the gold standard for the *S. stercoralis* infection diagnosis, previous studies have demonstrated its usefulness [30]. New tests based on molecular biology such as PCR could increase the accuracy of helminth infection diagnosis. Finally, *T. cruzi* PCR was determined only at one point, which may underestimate the kinetics of the parasite.

In summary, we observed a high prevalence of *S. stercoralis* infection among chronic Chagas disease patients attended in our tropical medicine unit. Strongyloidiasis was associated with significantly higher proportion of positive *T. cruzi* RT-PCR determined in peripheral blood. These data increase the scarce available information to understand the role of PCR techniques in the management of Chagas disease patients. Further studies are needed to deepen and confirm this interesting relationship.

Supporting Information

S1 Checklist. STROBE Checklist.
(DOCX)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FS IM. Performed the experiments: FS ES ASM IM. Analyzed the data: FS ES ASM MMG EC IM. Wrote the paper: FS ES ASM MMG EC IM.

References

- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problema becoming a world health problem. *Acta Trop.* 2010; 115: 14–21. doi: 10.1016/j.actatropica.2009.11.003 PMID: 19932071
- Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezas J et al. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20: 706–712. doi: 10.1111/1469-0691.12443 PMID: 24329884

3. Rassi A Jr, Rassi A, Marín-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010; 375: 1388–1402. doi: [10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X) PMID: [20399979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20399979/)
4. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejía-Jaramillo AM 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. doi: [10.1371/journal.pntd.0000931](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000931) PMID: [21264349](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21264349/)
5. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvao LM. 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. PMID: [12209329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12209329/)
6. Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg*. 1999; 60: 205–210. PMID: [10072137](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10072137/)
7. Lana M, Lopes LA, Martins HR, Bahia MT, Machado-de-Assis GF, Wendling AP et al. Clinical and laboratory status of patients with chronic Chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 1139–1147. PMID: [20140375](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20140375/)
8. Muñoz J, Gómez I Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chéjade P et al. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). *Acta Trop*. 2009; 111: 51–55. doi: [10.1016/j.actatropica.2009.02.005](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.02.005) PMID: [19426663](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19426663/)
9. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina J, Norman F, Navarro M, Monge-Maillou B, Díaz-Menéndez M et al. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 1108–1113. doi: [10.1111/j.1469-0691.2010.03423.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03423.x) PMID: [21073628](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21073628/)
10. Ramos JM, Torrés D, Amador C, Jover F, Pérez-Chacón F, Ponce Y et al. Multicenter epidemiological and clinical study on imported Chagas disease in Alicante, Spain. *Pathog Glob Health*. 2012; 106: 340–345. doi: [10.1179/2047773212Y.0000000039](https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000039) PMID: [23182138](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23182138/)
11. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Valerio L, Serre N, Roure S, Treviño B et al. Immunosuppression and Chagas disease; experience from a non-endemic country. *Clin Microbiol Infect*. 2015; 21: 854–860. doi: [10.1016/j.cmi.2015.05.033](https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.033) PMID: [26055418](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26055418/)
12. Pérez-Molina JA, Rodríguez-Guardado A, Soriano A, Pinazo MJ, Carrilero B, García-Rodríguez M et al. Chagas Study Group of the SEMTSI. Guidelines on the treatment of chronic coinfection by *Trypanosoma cruzi* and HIV outside endemic areas. *HIV Clin Trials*. 2011; 12: 287–298. doi: [10.1310/hct1206-287](https://doi.org/10.1310/hct1206-287) PMID: [22189148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22189148/)
13. Molina I, Gómez I Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro B, Serre N et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014; 370: 1899–1908. doi: [10.1056/NEJMoa1313122](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1313122) PMID: [24827034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24827034/)
14. Chammartin F, Scholte RG, Guimaraes LH, Tanner M, Utzinger J, Vounatsou P. Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13: 507–518. doi: [10.1016/S1473-3099\(13\)70071-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70071-9) PMID: [23562238](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23562238/)
15. Esen M, Mordmüller B, de Salazar PM, Adegnika AA, Agnandji ST, Schaumburg F et al. Reduced antibody response against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in the presence of *Trichuris trichiura*. *Vaccine*. 2012; 30: 7621–7624. doi: [10.1016/j.vaccine.2012.10.026](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.026) PMID: [23085365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23085365/)
16. Hübner MP, Layland LE, Hoerauf A. Helminths and their implication in sepsis - a new branch of their immunomodulatory behaviour? *Pathog Dis*. 2013; 69: 127–141. doi: [10.1111/2049-632X.12080](https://doi.org/10.1111/2049-632X.12080) PMID: [23929557](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23929557/)
17. World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2002; 905: 1–109.
18. Kuschnir E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardio*. 1985; 45: 249–256.
19. Ximenes CA. Técnica simplificada para o diagnóstico radiológico do megacolo chagásico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1984; 17: 23.
20. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chéjade P, Puig L, Vergés M et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007; 103: 195–200. PMID: [17662227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17662227/)
21. Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Gobbi F et al. Prevalence of stryngitoidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. *Epidemiol Infect*. 2015; 143: 452–460. doi: [10.1017/S0950268814001563](https://doi.org/10.1017/S0950268814001563) PMID: [24990510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24990510/)
22. Cancrini G, Bartoloni A, Paradisi F, Nuñez LE. Parasitological observations on three Bolivian localities including rural communities, cities and institutions. *Ann Trop Med Parasitol*. 1989; 83: 591–594. PMID: [2619373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2619373/)

23. Ramos JM, León R, Andreu M, de Las Parras ER, Rodríguez-Díaz JC, Esteban A et al. Serological study of *Trypanosoma cruzi*, *Strongyloides stercoralis*, HIV, human T cell lymphotropic virus (HTLV) and syphilis infections in asymptomatic Latin-American immigrants in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015; 109: 447–453. doi: [10.1093/trstmh/trv043](https://doi.org/10.1093/trstmh/trv043) PMID: [26065661](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26065661/)
24. Monteiro RV, Dietz JM, Raboy B, Beck B, De Vleeschouwer K, Baker A et al. Parasite community interactions: *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminthes infecting wild golden lion tamarins *Leontopithecus rosalia* and golden-headed lion tamarins *L. chrysomelas* (Callitrichidae, L., 1766). *Parasitol Res.* 2007; 101: 1689–1698. PMID: [17676342](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17676342/)
25. Rodríguez M, Terrazas LI, Márquez R, Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol.* 1999; 21: 177–185. PMID: [10320615](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10320615/)
26. Eschbach ML, Klemm U, Kolbaum J, Blankenhaus B, Brattig N, Breloer M. *Strongyloides ratti* infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice. *Parasite Immunol.* 2010; 32: 370–383. doi: [10.1111/j.1365-3024.2010.01199.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2010.01199.x) PMID: [20500666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20500666/)
27. Dutra WO, Menezes CA, Magalhaes LM, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol.* 2014; 36: 377–387. doi: [10.1111/pim.12107](https://doi.org/10.1111/pim.12107) PMID: [24611805](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24611805/)
28. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015; 373: 1295–1306. doi: [10.1056/NEJMoa1507574](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1507574) PMID: [26323937](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26323937/)
29. Pérez-Molina JA, Poveda C, Martínez-Pérez A, Guhl F, Monge-Maillo B, Fresno M et al. Distribution of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Bolivian migrants in Spain. *Infect Genet Evol.* 2014; 21: 440–442. doi: [10.1016/j.meegid.2013.12.018](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.018) PMID: [24389118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24389118/)
30. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Saugar JM, Rodríguez E, Pahissa A et al. Usefulness of *Strongyloides stercoralis* serology in the management of patients with eosinophilia. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90: 830–834. doi: [10.4269/ajtmh.13-0678](https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0678) PMID: [24615124](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615124/)

7 MÉTODOS DEL TRABAJO 2

7.1 Diseño y población del estudio

Ante los resultados del primer trabajo, se diseñó un estudio para confirmar la asociación de infección por *S. stercoralis* y mayor proporción de RT-PCR de *T. cruzi* positiva en una mayor cohorte de pacientes con EC. El segundo trabajo se trata de un estudio transversal realizado en el Hospital Universitario Vall d'Hebron y en el Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña (BSTC), donde se incluyeron a todos los donantes de sangre que fueron diagnosticados de EC desde el 2005 al 2015 mediante las técnicas de cribado realizadas durante la donación voluntaria de sangre en el BSTC. Desde 2005, en el BSTC se realiza un cribado para la detección de EC de manera rutinaria en todos aquellos donantes de sangre que hayan nacido (o cuya madre haya nacido) en una zona endémica para la EC, o que hayan residido en una zona endémica (92). En los casos en que el donante refería tener EC durante la entrevista previa a la donación, no se permitía la donación de sangre. En las muestras de sangre de los donantes en que se diagnostica EC, se realiza una RT-PCR de *T. cruzi* para detección de ADN.

De todos los pacientes incluidos se recogió información demográfica obtenida durante la entrevista previa a la donación (edad, sexo, país de origen), e información microbiológica (serologías y RT-PCR de *T. cruzi*). Las muestras de suero de los pacientes incluidos fueron enviadas al laboratorio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron para la realización de la serología de *S. stercoralis*.

7.2 Procedimientos

El diagnóstico de EC se realizó mediante la positividad de dos técnicas serológicas diferentes siguiendo las recomendaciones actuales de la Organización Mundial de la Salud (55): un ELISA con antígeno recombinante (ARCHITECT CHAGAS test o PRISM CHAGAS test, Abbott Laboratories, Wiesbaden, Germany), y un ELISA con antígeno nativo (Antigen ORTHO® *T. cruzi* ELISA Test System, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, New Jersey, United States). La RT-PCR para detectar ADN de *T. cruzi* en una muestra de sangre periférica se realizó siguiendo el protocolo descrito por Piron et al (91).

El diagnóstico de estrogiloidiasis se basó en la detección de IgG anti-*S. stercoralis* en suero mediante una técnica ELISA (SciMedx Corporation, Denville, NJ, United States). La serología se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit incluye pocillos de microtitulación recubiertos con la fracción soluble del antígeno de larva filariforme L3 de *S. stercoralis*. En este estudio, utilizamos un punto de corte de 0,200; el test se consideró positivo si el índice (proporción entre la densidad óptica medida en la muestra y 0,200) era igual o superior a 2. Además, basándonos en un estudio previo donde una técnica serológica similar fue utilizada, se analizaron los resultados teniendo en cuenta como positivo un índice igual o superior a 2.5, incrementándose la especificidad de la prueba a un 100% para el diagnóstico de una estrogiloidiasis confirmada (93).

7.3 Análisis estadístico

Aunque se incluyeron todos los pacientes que fueron diagnosticados de EC en el momento de la donación de sangre durante el periodo de 2005 a 2015 en el BSTC, se estimó un tamaño de la muestra para asegurar un poder estadístico suficiente.

Basándonos en nuestro estudio previo, asumimos unos porcentajes de positividad de RT-PCR de *T. cruzi* en ambos grupos de 35% y 75% respectivamente, con lo que 23 paciente por grupo aseguraría una potencia superior al 80% para mostrar diferencias entre ambos grupos (con un valor alfa inferior a 0,05). Las variables cualitativas se presentaron como números absolutos y proporciones, mientras que las variables cuantitativas se presentaron como medianas y rangos. El test de Chi-cuadrado o el test exacto de Fisher se utilizaron para comparar la distribución de variables cualitativas, y el test de la U de Mann-Whitney para comparar la distribución de variables cuantitativas. Se realizó un análisis multivariado usando un modelo de regresión logística binomial. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos cuando el valor p era inferior a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics (Versión 19.0; SPSS Inc, Chicago, IL, United States).

7.4 Confidencialidad de los datos y aspectos éticos

La recogida de datos se hizo con unos protocolos previamente establecidos y los datos se introdujeron en una base de datos con un sistema de codificación con el fin de proteger la información personal de cada paciente. Además, las muestras de suero fueron enviadas al Hospital Universitario Vall d'Hebron previa anonimización de las mismas. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron, y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes en el estudio en el momento de la donación de sangre. Los procedimientos fueron realizados de acuerdo con los requerimientos éticos establecidos en la Declaración de Helsinki revisada en 2013.

8 RESULTADOS DEL TRABAJO 2

Título: La infección por *Strongyloides stercoralis* aumenta la probabilidad de detectar ADN de *Trypanosoma cruzi* en sangre periférica en pacientes con enfermedad de Chagas.

Autores: Fernando Salvador¹, Elena Sulleiro², María Piron³, Adrián Sánchez-Montalvá¹, Silvia Sauleda³, Daniel Molina-Morant¹, Zaira Moure² e Israel Molina¹

¹Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Universitario Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, PROSICS Barcelona, Barcelona, España.

²Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, PROSICS Barcelona, Barcelona, España.

³Banco de Sangre y Tejidos de Cataluña, Laboratorio de Seguridad Transfusional, Barcelona, España.

Antecedentes: En un estudio previo realizado por nuestro grupo se observó que la infección por *S. stercoralis* en pacientes con EC estaba asociada a una mayor proporción de pacientes con detección de ADN de *T. cruzi* medida por RT-PCR en sangre periférica. El objetivo de este estudio es confirmar esta asociación en una cohorte mayor de pacientes.

Métodos: Se trata de un estudio transversal donde se incluyeron todos los pacientes diagnosticados de EC desde el 2005 al 2015 mediante el cribado realizado en la donación de sangre en el BSTC. Se recogieron datos demográficos y del resultado de la RT-PCR de *T. cruzi*. El diagnóstico de infección por *S. stercoralis* se realizó mediante una técnica serológica en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (Barcelona, España).

Resultados: Un total de 202 donantes de sangre diagnosticados de EC fueron incluidos. La RT-PCR de *T. cruzi* fue positiva en 72 (35,6%) pacientes, y la serología de *S. stercoralis* fue positiva en 22 (10,9%) pacientes. Los pacientes con una serología para *S. stercoralis* positiva tuvieron una mayor proporción de RT-PCR de *T. cruzi* positiva comparado con los pacientes con serología negativa (54,5% versus 33,3%, $p=0,05$). Esta diferencia se incrementó cuando se tuvo en cuenta un punto de corte para la serología de 2.5, lo que incrementa la especificidad del test para diagnosticar una strongiloidiasis confirmada (60% versus 33%, $p=0,017$).

Conclusiones: Los pacientes con EC que tienen una serología para *S. stercoralis* positiva tienen una mayor proporción de RT-PCR de *T. cruzi* positiva en sangre periférica que aquellos que tiene una serología negativa, lo que refleja el potencial efecto inmunomodulador de *S. stercoralis* en paciente coinfectados con *T. cruzi*.

Trabajo publicado en: Tropical Medicine and International Health. 2017; 22: 1436-1441. Doi: 10.1111/tmi.12970

9 DISCUSIÓN

Se han realizado por tanto dos trabajos en población latinoamericana con EC en fase crónica, donde se ha observado una elevada proporción de pacientes coinfectados con una helmintiasis intestinal. Además, los pacientes que presentan una coinfección por un geohelminto (y en concreto por *S. stercoralis*) tienen una mayor probabilidad de presentar una RT-PCR de *T. cruzi* positiva en sangre periférica que aquellos pacientes no coinfectados. A continuación, y dado que el segundo trabajo es una confirmación de los hallazgos observados en el primero, se realizará una discusión conjunta de ambos trabajos.

En ambos trabajos, la población de estudio es una población joven, con mayoría de mujeres, la mayor parte de ellos en la fase crónica indeterminada (sin afectación visceral), y siendo Bolivia el país de origen más frecuentemente observado entre los pacientes. Este perfil de población de pacientes con EC es similar al encontrado en otras series de pacientes descritos en nuestro país y otros países europeos, donde el porcentaje de pacientes procedentes de Bolivia es superior al 90% (8, 10, 11). Por tanto, se trata de una población representativa de los pacientes con EC en zona no endémica.

De todas maneras, llama la atención que en el segundo trabajo, a pesar de que Bolivia es el país de origen más frecuente, el porcentaje es inferior al del primer trabajo y al del resto de series mencionadas (77.2%). Esto es probablemente debido a que la fuente de los pacientes es el BSTC, donde se realiza cribado universal a todas las personas procedentes de zona endémica; en el segundo trabajo y las otras series, la fuente de los pacientes son aquellos diagnosticados en Unidades de Medicina Tropical, donde puede haber un sesgo debido a la concienciación de los profesionales sanitarios en cribar población boliviana. Algunos estudios ya comentan el infradiagnóstico de la EC en

población latinoamericana viviendo en Europa, y muy probablemente sea mayor en los pacientes procedentes de países diferentes a Bolivia, precisamente por esta falta de sospecha en estos pacientes (94).

Ya es conocido que la prevalencia de geohelmintiasis en Latinoamérica es elevada. Una reciente revisión de la literatura sobre la prevalencia de geohelminfos en Sudamérica estimó una prevalencia de infección por *A. lumbricoides* de 15.6%, una prevalencia de infección por *T. trichiura* de 12.5% y una prevalencia de infección por uncinarias de 11.9% (95). Respecto a la prevalencia de infección por *S. stercoralis*, los datos son mucho más limitados, ya que los estudios de prevalencia no se realizan con pruebas diagnósticas suficientemente sensibles para diagnosticar esta parasitosis; aun así, hay áreas de Sudamérica con prevalencias superiores al 20%, como algunas zonas de Argentina, Ecuador, Venezuela, Perú y Brasil (96).

En cuanto a Bolivia, la información sobre la prevalencia de estrongiloidiasis es escasa, y procede de estudios antiguos realizados en población de riesgo (97, 98). Un estudio publicado recientemente muestra una seroprevalencia para estrongiloidiasis del 6% en el año 2013 en población del Chaco boliviano (99). Sin embargo, también tenemos información procedente de estudios de prevalencia realizados en población boliviana que reside en países europeos. Dos estudios españoles mostraron una seroprevalencia para *S. stercoralis* del 18% y 44% respectivamente (100, 101). Otro estudio realizado en Suiza observó una seroprevalencia del 8.4% en población latinoamericana en general, siendo el 48% procedente de Bolivia (102). Por tanto, teniendo en cuenta que en las mismas zonas en que la EC es endémica, también son muy prevalentes las infecciones por geohelminfos (incluyendo la infección por *S. stercoralis*), no es extraño que la coinfección entre EC y geohelminfos se dé con frecuencia.

La prevalencia de infección por helmintos observada en el primer estudio fue del 18.2%, siendo en todos los casos una infección por *S. stercoralis* (prácticamente todos diagnosticados a través de serología) excepto en un caso, que tenía una infección por *Hymenolepis nana*. En el segundo estudio sólo se realizó serología de *S. stercoralis*, ya que sólo se disponía de sueros de los pacientes. En ningún caso se diagnosticó de otras geohelminCIAS (*A. lumbricoides*, *T. trichiura* y uncinarias), lo que no es de extrañar, ya que la mediana de tiempo de residencia fuera del país de origen de los pacientes fue de 9 años, tiempo suficiente para que se rompa el ciclo biológico de éstos parásitos y se eliminen, cosa que no pasa con *S. stercoralis*, que debido a su ciclo de autoinfección puede permanecer durante décadas en el hospedador.

En el primer estudio, prácticamente todos los casos de infección por *S. stercoralis* se diagnosticaron por serología, y en el segundo estudio, ésta técnica fue la única que se pudo realizar para el diagnóstico. Aunque la detección de anticuerpos IgG frente a *S. stercoralis* no es la prueba de confirmación para el diagnóstico de estrongiloidiasis (es difícil diferenciar infección actual de infección pasada, reacción cruzada en situaciones de infección por otros nematodos), cada vez hay más datos que demuestran la utilidad de estas técnicas tanto en el diagnóstico de la estrongiloidiasis como en el seguimiento de los pacientes tras el tratamiento para confirmar la curación (103, 104). Además, en el segundo trabajo se realizaron también los cálculos teniendo en cuenta un punto de corte de la serología más alto (se consideraba positiva con un índice igual o superior a 2.5), lo que aumenta la especificidad de la prueba (93).

La afectación visceral por la EC sólo se pudo evaluar en el primer estudio, siendo la proporción de pacientes que presentaron algún grado de afectación cardíaca de 18.2% (ninguno con cardiopatía avanzada), y un 27.3% de los pacientes presentaron afectación digestiva (sólo dos con megacolon). Como se ha comentado previamente, estos

porcentajes son similares a los encontrados en otras series similares descritas en zona no endémica para EC (8, 10, 11). Al comparar la afectación cardíaca y digestiva entre los pacientes con coinfección helmíntica y sin coinfección, no se encontraron diferencias entre ambos grupos; aunque el porcentaje de afectación cardíaca fue ligeramente superior en el grupo de pacientes con coinfección (25% versus 16.7%), ésta diferencia no era significativamente estadística. Por tanto, con los datos de nuestro estudio no podemos demostrar que el hecho de tener una coinfección helmíntica influya en la presentación clínica de la EC, aunque esto puede deberse al reducido tamaño de la muestra del primer estudio.

Sin embargo, sí que se encontraron diferencias respecto a los hallazgos microbiológicos. La probabilidad de tener una parasitemia de *T. cruzi* detectable (mediante detección de ADN de *T. cruzi* por RT-PCR en sangre periférica) fue mayor en el grupo de pacientes con coinfección helmíntica (y, en concreto, por *S. stercoralis*) comparado con el grupo de pacientes no coinfectados. En el primer estudio la proporción de RT-PCR de *T. cruzi* positiva fue de 75% y 35.2% ($p=0.021$) respectivamente en cada grupo; en el caso del segundo estudio, las proporciones fueron de 54.5% y 33.3% ($p=0.05$) respectivamente, diferencia que aumenta al considerar como punto de corte de la serología de *S. stercoralis* un índice de 2.5 (60% versus 33%, $p=0.017$).

Se ha comentado anteriormente que la DTU de *T. cruzi*, que tiene una marcada distribución geográfica, puede tener implicación en la presentación clínica, los datos microbiológicos y la respuesta al tratamiento (13). En ambos estudios, el origen de los pacientes fue mayoritariamente de Bolivia, donde circulan unas DTUs determinadas (principalmente TcII y TcV), lo que puede actuar como un factor de confusión a la hora de analizar los resultados. En el primer estudio sólo 2 pacientes tenían una nacionalidad diferente a la boliviana, así que era difícil analizar este hecho. Sin embargo, en el

segundo estudio, más del 20% de los pacientes no eran bolivianos. En el análisis univariado, la proporción de pacientes procedentes de Bolivia era mayor en el grupo de pacientes coinfectados comparado con los no coinfectados. No obstante, al realizar el estudio multivariado, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos respecto a la nacionalidad, tanto en el análisis inicial como en el realizado con un punto de corte de la serología de *S. stercoralis* de un índice de 2.5. Por tanto, las diferencias encontradas respecto a la detección de la parasitemia se debieron únicamente a la presencia de coinfección por *S. stercoralis*, y no por proceder de Bolivia.

Este interesante hallazgo de cómo la coinfección por un helminto puede modificar la parasitemia de *T. cruzi* (o la probabilidad de detectar ADN en sangre periférica) es la primera vez que se ha descrito en personas con EC. Sin embargo, hay estudios previos realizados en modelo animal que describen hallazgos similares. Un estudio realizado por Monteiro *et al* observó que primates (tamarinos león dorados) con infección por *T. cruzi* presentaban una proporción superior de parasitemia detectable (medida por hemocultivo de *T. cruzi*) en aquellos primates coinfectados por helmintos intestinales de la familia Trichostrongylidae que en aquellos casos en que no presentaban dicha coinfección (105). Estos resultados son totalmente coherentes con los resultados observados en nuestros dos estudios. Otro estudio realizado en modelo murino profundiza más en esta relación entre la coinfección helmíntica y la parasitemia de *T. cruzi*. Se midió la parasitemia de *T. cruzi* en ratones infectados sin coinfección helmíntica, en ratones que se infectaron tras 2-4 semanas de haber sido infectados con *Taenia crassiceps* (coinfección temprana), y en ratones infectados tras 8-12 semanas de haber sido infectados con *T. crassiceps* (coinfección tardía). La parasitemia fue significativamente mayor en los ratones con una coinfección tardía (donde se espera una

respuesta inmune predominantemente Th2) que en aquellos con una coinfección temprana o sin coinfección (106).

Este efecto que produce en el grado de parasitemia de *T. cruzi* la coinfección por *S. stercoralis* puede ser explicado por la diferente respuesta inmunológica que despierta cada uno de estos parásitos en el hospedador. La infección por *S. stercoralis* produce una respuesta inmune tipo Th2 (con liberación de citoquinas como la IL-3, IL-4, IL-5, IL-13) y una inducción de citoquinas reguladoras (IL-10) que conducen a una supresión de la liberación de citoquinas proinflamatorias (como el interferón γ) características de la respuesta inmune tipo Th1 (107). Sin embargo, este perfil de citoquinas proinflamatorias características de la respuesta inmune Th1 (interferón γ y factor de necrosis tumoral α) son precisamente las que se liberan durante la fase aguda de la EC como respuesta del hospedador para intentar controlar la elevada parasitemia que aparece en estas fases iniciales de la infección (25).

Por tanto, tiene lógica pensar que una respuesta inmunológica Th2 inducida por una infección helmíntica, con la consecuente supresión de la respuesta inmune Th1, lleve al paciente con EC a un menor control de la parasitemia de *T. cruzi*, siendo más probable que detectemos el ADN de *T. cruzi* por RT-PCR en sangre periférica.

Otros estudios que profundizan en la respuesta inmunológica que se produce en el hospedador infectado por *T. cruzi* podrían apoyar esta hipótesis. Es conocido que durante el embarazo, de manera fisiológica, hay un aumento de la respuesta inmune Th2 y una supresión de la respuesta Th1, todo ello para aumentar la supervivencia del feto, pero incrementando la susceptibilidad de la embarazada a determinadas infecciones (108). También se sabe que durante el embarazo en mujeres con EC, la parasitemia es mayor, siendo más probable observar una RT-PCR de *T. cruzi* positiva en sangre

periférica (109). Un estudio reciente realizado en Bolivia con mujeres embarazadas con EC observó que aquellas que vivían en domicilios con presencia de triatominos infectados por *T. cruzi* y, por tanto, expuestas a reinfecciones (lo que potencia la respuesta inmune Th1), tenían mayor porcentaje de RT-PCR para *T. cruzi* positiva que aquellas que vivían en domicilios sin presencia del vector y, por tanto, con baja probabilidad de reinfección (110). Todos estos estudios son coherentes con la hipótesis de la modificación de la parasitemia de *T. cruzi* en función del balance entre la respuesta inmune Th1/Th2.

Por tanto, teniendo en cuenta los resultados de ambos estudios, podemos concluir que la infección por *S. stercoralis* en pacientes con EC aumenta la probabilidad de detectar ADN de *T. cruzi* por RT-PCR en sangre periférica. Este hallazgo puede tener implicaciones importantes y debe tenerse en cuenta a la hora de interpretar los resultados de la RT-PCR de *T. cruzi* en determinadas situaciones.

Una de las utilidades de ésta técnica diagnóstica que está teniendo más relevancia en los últimos años es su utilización como herramienta para evaluar nuevas opciones terapéuticas para la EC dentro de ensayos clínicos: un resultado positivo tras la finalización del tratamiento significa un fracaso terapéutico (64, 65, 72, 73). Si la presencia de una infección por *S. stercoralis* (u otro helminto) puede aumentar la probabilidad de tener una RT-PCR de *T. cruzi* positiva, el diagnóstico de infecciones por helmintos en personas que participan en estos ensayos clínicos tiene una especial relevancia, especialmente si los ensayos clínicos se llevan a cabo en áreas endémicas para la EC, donde la infección por geohelminos es altamente frecuente.

Otra situación en que la detección de RT-PCR de *T. cruzi* tiene importancia es en las mujeres embarazadas con EC, debido a que la parasitemia detectable durante el

embarazo se ha asociado a una mayor probabilidad de transmisión congénita de la EC (111). Por tanto, nuevamente, una infección por *S. stercoralis* podría aumentar la probabilidad de tener una RT-PCR de *T. cruzi* positiva, lo que podría llevar a un mayor riesgo de transmisión congénita, aunque esta hipótesis debería ser confirmada mediante estudios diseñados para responder esta hipótesis.

10 LIMITACIONES

La presente tesis doctoral se compone de dos artículos, siendo el objetivo del segundo estudio la confirmación de los resultados que se observaron en el primer estudio. Esto hace que los estudios sean complementarios y que las limitaciones que se encuentran en uno se hayan podido subsanar en el otro y viceversa.

En el primer estudio la principal limitación es el reducido tamaño de la muestra, lo que obliga a interpretar los resultados con cautela. Sin embargo, en el segundo estudio, realizado con una muestra mucho mayor y suficiente para aportar una potencia estadística adecuada, arroja unos resultados similares. En el caso del segundo estudio, la limitación principal es que no se disponen de datos clínicos como la presencia de afectación visceral por EC (cardíaca o digestiva), presencia de eosinofilia, estudio coproparasitológico. No obstante, estos datos sí que están presentes en el primer estudio.

Hay algunas limitaciones que son comunes a los dos estudios. La más relevante es el hecho de que el diagnóstico de estrongiloidiasis se ha hecho casi en la totalidad de los pacientes en base a la positividad de técnicas serológicas que, como ya se ha comentado, puede tener problemas de especificidad al no poder diferenciar estas técnicas entre infección pasada y actual, o presentar reacciones cruzadas con otros helmintos. Aun así, la serología de *S. stercoralis* presenta una muy buena rentabilidad para el diagnóstico de estrongiloidiasis y su seguimiento tras tratamiento (103, 104). Y no sólo eso, si no que al aumentar el punto de corte para considerar la serología como positiva, se incrementa la especificidad de la técnica para el diagnóstico de una estrongiloidiasis confirmada hasta prácticamente el 100% (93). Por otro lado, el hecho de que los pacientes de nuestros estudios presenten una media de residencia en nuestro

país de casi 10 años, reduce de manera drástica la posibilidad de tener una infección por otro geohelminto.

Otra limitación común a los dos estudios es que sólo se evalúa una sola RT-PCR de *T. cruzi* en sangre periférica por paciente. La parasitemia en la fase crónica de la EC, a pesar de que siempre es de bajo nivel (excepto en las reactivaciones), es algo dinámico y oscilante, y por tanto, es posible que en el mismo paciente la RT-PCR de *T. cruzi* pueda tener resultados diferentes si se mide en momentos distintos.

11 CONCLUSIONES

1. La prevalencia de infección por helmintos intestinales en población latinoamericana residente en Barcelona con EC en fase crónica o indeterminada fue elevada (10.9%-18.2%).
2. La helmintiasis diagnosticada mayoritariamente fue la infección por *S. stercoralis*, que estaba presente en todos los pacientes coinfectados excepto en un caso.
3. La infección por *S. stercoralis* en pacientes con EC en fase crónica o indeterminada no modifica la presentación clínica respecto a la presencia o no de afectación cardíaca o digestiva.
4. Los pacientes con EC en fase crónica o indeterminada que presentan una infección por *S. stercoralis* tienen una probabilidad mayor de tener una parasitemia detectable medida por detección de ADN de *T. cruzi* por RT-PCR en sangre periférica comparado con aquellos pacientes sin coinfección.
5. Estos hallazgos se deben de tener en cuenta a la hora de interpretar los resultados de la RT-PCR de *T. cruzi*, especialmente cuando se utiliza esta herramienta para evaluar el fracaso tras la realización de tratamiento específico para la EC.

12 LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

En base a los resultados obtenidos en los estudios que componen la presente tesis doctoral, se puede concluir que la presencia de infección por *S. stercoralis* en pacientes con EC aumenta la probabilidad de detectar ADN de *T. cruzi* por RT-PCR en sangre periférica. El siguiente paso es comprobar si al eliminar la infección por *S. stercoralis*, la proporción de pacientes con RT-PCR de *T. cruzi* positiva se iguala a la de los pacientes que no tenían la coinfección. Para poder demostrar este siguiente paso, se ha diseñado un estudio observacional prospectivo en el que a los pacientes con EC se les realizará estudio coproparasitológico, serología de *S. stercoralis*, y RT-PCR de *T. cruzi* en sangre periférica de manera sistemática. Aquellos en que se diagnostique una infección por *S. stercoralis* recibirán tratamiento con ivermectina. Posteriormente, se realizará seguimiento durante 6 meses a todos los pacientes (tanto los coinfectados que han recibido tratamiento con ivermectina como los que no presentan coinfección) con realización de RT-PCR de *T. cruzi* de manera bimensual. De esta manera se podrá evaluar si la proporción de RT-PCR de *T. cruzi* positiva se iguala en ambos grupos tras el periodo de seguimiento.

Otra tarea que queda por hacer, y que se puede realizar dentro del estudio anteriormente descrito, es determinar el perfil de citoquinas séricas en los pacientes incluidos, para ver si hay un predominio de respuesta inmune Th1 o Th2, y si éste se relaciona con la ausencia o presencia de infección por helmintos respectivamente.

13 BIBLIOGRAFÍA

1. Chagas C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfología e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homen. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1909; 1: 159-218.
2. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update on 2010 estimates. Wkly Epidemiol Rec. 2015; 90: 33-43.
3. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010; 465: S6-7.
4. Pérez-Molina JA, Molina I. Chagas disease. Lancet. 2018; 391: 82-94.
5. Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: a Latin American health problema becoming a world health problem. Acta Trop. 2010; 115: 14-21.
6. Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, Karunakara U, Ribeiro I, Cohen RM, Pecoul B. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. PLoS Negl Trop Dis. 2013. 7: e2300.
7. Pinto A, Pett S, Jackson Y. Identifying Chagas disease in Australia: An emerging challenge for general practitioners. Aust Fam Physician. 2014; 43: 440-442.
8. Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Pou D, Sánchez-Montalvá A, Cabezos J, Soriano A, Serre N, Gómez i Prat J, Pahissa A, Molina I. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. Clin Microbiol Infect. 2014; 20: 706-712.
9. Muñoz J, Gómez I Prat J, Gállego M, Gimeno F, Treviño B, López-Chéjade P, Ribera O, Molina L, Sanz S, Pinazo MJ, Riera C, Posada EJ, Sanz G, Portús M, Gascón J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). Acta Trop, 2009; 111: 51-55.

10. Pérez-Ayala A, Pérez-Molina J, Norman F, Navarro M, Monge-Maillo B, Díaz-Menéndez M, Peris-García J, Flores M, Cañavate C, López-Vélez R. Chagas disease in Latin American migrants: a Spanish challenge. *Clin Microbiol Infect*, 2011; 17: 1108-1113.
11. Valerio-Sallent L, Roure S, Basile L, Ballesteros LA, Sabrià M, Rodrigo C; Grupo Metropolitano de estudio del Chagas. A clinical and epidemiological study of the *Trypanosoma cruzi* infected population in the north metropolitan area of Barcelona. *Rev Clin Esp*. 2012; 212: 329-336.
12. Requena-Méndez A, Albajar-Viñas P, Angheben A, Chiodini P, Gascón J, Muñoz J; Chagas Disease COHEMI Working Group. Health policies to control Chagas disease transmission in European countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3245.
13. Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012; 12: 240-253.
14. Yamagata Y, Nakagawa J. Control of Chagas disease. *Adv Parasitol*. 2006; 61: 129-165.
15. Zeledón R, Rabinovich JE. Chagas' disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol*, 1981; 26: 101-33.
16. Howard EJ, Xiong X, Carlier Y, Sosa-Estani S, Buekens P. Frequency of the congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: a systematic review and meta-analysis. *BJOG* 2014; 121: 22-33.

17. Otero S, Sulleiro E, Molina I, Espiau M, Suy A, Martín-Nalda A, Figueras C. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in non-endemic areas: evaluation of a screening program in a tertiary care hospital in Barcelona, Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 87: 832-836.
18. Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis,* 2012; 54: 845-52.
19. Schmunis GA. Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz,* 1999; 94 (suppl 1): 93-101.
20. Salvador F, Len O, Molina I, Sulleiro E, Sauleda S, Bilbao I, Castells L, Pont T, Gavaldà J, Pahissa A. Safety of liver transplantation with Chagas disease-seropositive donors for seronegative recipients. *Liver Transpl,* 2011; 17: 1304-1308.
21. Bern C. Chagas disease. *N Engl J Med.* 2015; 373: 456-466.
22. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med* 2008; 8: 510-518.
23. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 2001; 31: 550-554.
24. Burgos JM, Diez M, Vigliano C, Bisio M, Risso M, Duffy T, Cura C, Bruses B, Favalaro L, Leguizamon MS, Lucero RH, Laguens R, Levin MJ, Favalaro R, Schijman AG. Molecular identification of *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in end-stage chronic Chagas heart disease and reactivation after heart transplantation. *Clin Infect Dis.* 2010; 51: 485-495.
25. Dutra WO, Menezes CAS, Magalhães LMD, Gollob KJ. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. *Parasite Immunol* 2014; 36: 377-387.
26. Machado FS, Dutra WO, Esper L, Gollob KJ, Teixeira MM, Factor SM, Weiss LM, Nagajyothi F, Tanowitz HB, Garg NJ. Current understanding of

- immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. *Semin Immunopathol.* 2012; 34: 753-770.
27. Laranja FS, Dias E, Nobrega G, Miranda A. Chagas' disease. A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation.* 1956; 14: 1035-1060.
28. Pinto AY, Valente SA, Valente VDC, Ferreira Junior AG, Coura JR. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region: study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41: 602-614.
29. Alarcón de Noya B, Díaz Bello Z, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Mauriello L, Zavala-Jaspe R, Suarez JA, Abate T, Naranjo L, Paiva M, Rivas L, Castro J, Márques J, Mendoza I, Acquatella H, Torres J, Noya O. Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis* 2010; 201: 1308-1315.
30. Rassi Jr A, Rassi A, Marín-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*, 2010; 375: 1388-1402.
31. Coura JR, Anunziato N, Willcox HP. Chagas disease morbidity. I- Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1983; 78: 363-372.
32. Coura JR, de Abreu LL, Dubois LE, Lima FD, de Arruda Junior E, Willcox HP, Anunziato N, Petana W. Morbidity of Chagas' disease. II- Sectional studies in 4 field areas in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1984; 79: 101-124.
33. Brenière SF, Carrasco R, Revollo S, Aparicio G, Desieux P, Tibayrenc M. Chagas' disease in Bolivia: clinical and epidemiological features and zymodeme variability of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from patients. *Am J Trop Med Hyg.* 1989; 41: 521-529.

34. Pless M, Juranek D, Kozarsky P, Steurer F, Tapia G, Bermudez H. The epidemiology of Chagas' disease in a hyperendemic area of Cochabamba, Bolivia: a clinical study including electrocardiography, seroreactivity to *Trypanosoma cruzi*, xenodiagnosis, and domiciliary triatomine distribution. *Am J Trop Med Hyg.* 1992; 47: 539-546.
35. Borges-Pereira J, Zauza PL, Galhardo MC, Nogueira JD, Pereira GR, Cunha RV. Chagas disease in a urban population of the health district of Rio Verde, Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2001; 34: 459-466.
36. Borges-Pereira J, Castro JA, Campos JH, Nogueira JdeS, Zauza PL, Marques P, Cardoso MA, Britto C, Araujo AJ. Study of the infection and morbidity of Chagas disease in municipality of João Costa: National Park Serra da Capirivara, Piauí, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002; 35: 315-22.
37. Sánchez-Guillén MC, López-Colombo A, Ordóñez-Toquero G, Gómez-Albino I, Ramos-Jiménez J, Torres-Rasgado E, Salgado-Rosas H, Romero-Díaz M, Pulido-Pérez P, Pérez-Fuentes R. Clinical Forms of *Trypanosoma cruzi* infected individuals in the chronic phase of Chagas disease in Puebla, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006; 101: 733-740.
38. Moretti E, Castro I, Franceschi C, Basso B. Chagas disease: serological and electrocardiographic studies in Wichi and Creole communities of Misión Nueva Pompeya, Chaco, Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010; 105: 621-627.
39. Lescure FX, Paris L, Elghouzzi MH, Le Loup G, Develoux M, Touafek F, Mazier D, Pialoux G. Experience of targeted screening of Chagas disease in Ile-de France. *Bull Soc Pathol Exot.* 2009; 102: 295-299.
40. Jackson Y, Chappuis F. Chagas disease in Switzerland: history and challenges. *Euro Surveill.* 2011; 16: 19963.

41. Ramos JM, Torrús D, Amador C, Jover F, Pérez-Chacón F, Ponce Y, Arjona FJ, Caro E, Martínez-Peinado C, Gallegos I, Cuadrado JM, Tello A, Gutiérrez F. Multicenter epidemiological and clinical study on imported Chagas disease in Alicante, Spain. *Pathog Glob Health*. 2012; 106: 340-345.
42. Rassi A, Little WC. Chagas' heart disease. *Clin Cardiol* 2000; 23: 883-889.
43. Gali WL, Sarabanda AV, Baggio JM, Ferreira LG, Gomes GG, Marin-Neto JA, Junqueira LF. Implantable cardioverter-defibrillators for treatment of sustained ventricular arrhythmias in patients with Chagas' heart disease: comparison with a control group treated with amiodarone alone. *Europace*. 2014; 16: 674-680.
44. Sánchez-Montalvá A, Salvador F, Rodríguez-Palomares J, Sulleiro E, Sao-Avilés A, Roure S, Valerio L, Evangelista A, Molina I. Chagas cardiomyopathy: usefulness of EKG and echocardiogram in a non-endemic country. *PLoS One*. 2016; 11: e0157597.
45. Garcia-Alvarez A, Sitges M, Pinazo MJ, Regueiro-Cueva A, Posada E, Poyatos S, Ortiz-Pérez JT, Heras M, Azqueta M, Gascon J, Sanz G. Chagas cardiomyopathy: the potential of diastolic dysfunction and brain natriuretic peptide in the early identification of cardiac damage. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4: e826.
46. Sabino EC, Ribeiro AL, Salemi VM, Di Lorenzo Oliveira C, Antunes AP, Menezes MM, Ianni BM, Nastari L, Fernandes F, Patavino GM, Sachdev V, Capuani L, de Almeida-Neto C, Carrick DM, Wright D, Kavounis K, Goncalvez TT, Carneiro-Proietti AB, Custer B, Busch MP, Murphy EL; National Heart, Lung, and Blood Institute Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II), International Component. Ten-year incidence of Chagas cardiomyopathy among asymptomatic *Trypanosoma cruzi*-seropositive former blood donors. *Circulation*. 2013; 127: 1105-1115.

47. Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* 2006; 355: 799-808.
48. Salvador F, Mego M, Sánchez-Montalvá A, Morís M, Ramírez K, Accarino A, Malagelada JR, Azpiroz F, Molina I. Assessment of rectocolonic morphology and function in patients with Chagas disease in Barcelona (Spain). *Am J Trop Med Hyg.* 2015; 92: 898-902.
49. Sánchez-Montalvá A, Moris M, Mego M, Salvador F, Accarino A, Ramírez K, Azpiroz F, Ruiz de León A, Molina I. High resolution esophageal manometry in patients with Chagas disease: a cross-sectional evaluation. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10: e4416.
50. Nunes MC, Kreuser LJ, Ribeiro AL, Sousa GR, Costa HS, Botoni FA, de Souza AC, Gomes Marques VE, Fernandez AB, Teixeira AL, da Costa Rocha MO. Prevalence and risk factors of embolic cerebrovascular events associated with Chagas heart disease. *Glob Heart.* 2015; 10: 151-157.
51. Nunes MCP, Barbosa MM, Ribeiro ALP, Barbosa FBL, Rocha MOC. Ischemic cerebrovascular events in patients with Chagas cardiomyopathy: a prospective follow-up study. *J Neurol Sci.* 2009; 278: 96-101.
52. Pinazo MJ, Posada Ede J, Izquierdo L, Tassies D, Marques AF, de Lazzari E, Aldasoro E, Muñoz J, Abras A, Tebar S, Gallego M, de Almeida IC, Reverter JC, Gascon J. Altered hypercoagulability factors in patients with chronic Chagas disease: potential biomarkers of therapeutic response. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10: e0004269.

53. Bern C. Chagas disease in the immunosuppressed host. *Curr Opin Infect Dis.* 2012; 25: 450-457.
54. Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Vallerio L, Serre N, Roure S, Treviño B, Pou D, Sulleiro E, Bocanegra C, Molina I. Immunosuppression and Chagas disease; experience from a non-endemic country. *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21: 854-860.
55. World Health Organization (WHO). Control of Chagas disease. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 2002; 905: 1-109.
56. Bern C, Martin DL, Gilman RH. Acute and congenital Chagas disease. *Adv Parasitol.* 2011; 75: 19-47.
57. Brener ZE, Andrade ZA, Barral-Neto M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2nd edn. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
58. Flores-Chávez M, Cruz I, Rodríguez M, Nieto J, Franco E, Gárate T, Cañavate C. Comparison of conventional and non-conventional serological tests for the diagnosis of imported Chagas disease in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2010; 28: 284-293.
59. Riera C, Verges M, Iniesta L, Fisa R, Gállego M, Tebar S, Portús M. Identification of a Western blot pattern for the specific diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection in human sera. *Am J Trop Med Hyg.* 2012; 86: 412-416.
60. Moure Z, Angheben A, Molina I, Gobbi F, Espasa M, Anselmi M, Salvador F, Tais E, Sánchez-Montalvá A, Pumarola T, Albajar-Viñas P, Sulleiro E. Serodiscordance in chronic Chagas disease diagnosis: a real problem in non-endemic countries. *Clin Microbiol Infect.* 2016; 22: 788-792.
61. Sánchez-Camargo CL, Albajar-Viñas P, Wilkins PP, Nieto J, Leiby DA, Paris L, Scollo K, Flórez C, Guzmán-Bracho C, Luquetti AO, Calvo N, Tadokoro K, Saez-Alquezar A, Palma PP, Martin M, Flevaud L. Comparative evaluation of 11

commercialized rapid diagnostic tests for detecting *Trypanosoma cruzi* antibodies in serum banks in areas of endemicity and nonendemicity. *J Clin Microbiol.* 2014; 52: 2506-2512.

62. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hijar G, Zulantay I, Lucero RH, Velazquez E, Tellez T, Sanchez Leon Z, Galvão L, Nolder D, Monje Rumi M, Levi JE, Ramirez JD, Zorrilla P, Flores M, Jercic MI, Crisante G, Añez N, De Castro AM, Gonzalez CI, Acosta Viana K, Yachelini P, Torrico F, Robello C, Diosque P, Triana Chavez O, Aznar C, Russomando G, Büscher P, Assal A, Guhl F, Sosa Estani S, DaSilva A, Britto C, Luquetti A, Ladzins J. 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.

63. Gomes ML, Galvao LM, Macedo AM, Pena SD, Chiari E. Chagas' disease diagnosis: Comparative analysis of parasitologic, molecular, and serologic methods. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 60: 205-210.

64. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro B, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2014; 370: 1899-1908.

65. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 2015; 373: 1295-1306.

66. Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, DeLorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, Richle R, Brener Z. Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Antimicrob Agents Chemother.* 1967; 7: 513-519.
67. Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A, Treviño B, Serre N, Sao Avilés A, Almirante B. Toxic profile of benznidazole in patients with chronic Chagas disease: risk factors and comparison of the product from two different manufacturers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59: 6125-6131.
68. Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002; 97: 3-24.
69. Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2011; 364: 2527-2534.
70. Coura JR, Borges-Pereira J. Chronic phase of Chagas disease: Why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106: 641-645.
71. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, Postan M, Armenti A.. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: A nonrandomized trial. *Ann Intern Med.* 2006; 144: 724-734.
72. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, Apt W, Beloscar J, Gascon J, Molina I, Echeverria LE, Colombo H, Perez-Molina JA, Wyss F, Meeks B, Bonilla LR, Gao P, Wei B, McCarthy M, Yusuf S; STOP-CHAGAS Investigators. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic T. Cruzi Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 69: 939-947.

73. Torrico F. E1224 — results of proof of concept clinical trial in patients with chronic indeterminate Chagas disease. Presented in: 62nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene. 2013.
74. WHO. Soil-transmitted helminth infection. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs366/en>. Último acceso 18/01/2018.
75. Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker SJ. Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasit Vectors*. 2014; 7: 37.
76. Olsen A, Van Lieshout L, Marti H, Polderman T, Polman K, Steinmann P, Stothard R, Thybo S, Verweij JJ, Magnussen P. Strongyloidiasis—the most neglected of the neglected tropical diseases? *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009; 103: 967-972.
77. Puthiyakunnon S, Boddu S, Li Y, Zhou X, Wang C, Li J, Chen X. Strongyloidiasis—an insight into its global prevalence and management. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e3018.
78. Maizels RM, McSorley HJ. Regulation of the host immune system by helminth parasites. *J Allergy Clin Immunol*. 2016; 138: 666-675.
79. Hewitson JP, Grainger JR, Maizels RM. Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol*. 2009; 167: 1-11.
80. Fonte-Galindo L, Baldriche-Acosta J, Sarracent-Pérez J, Hernández-Barrios Y, Fong-González A. helminth regulation of host immune responses. *Rev Cub Med Trop*. 2016; 68: 1-19.
81. Hübner MP, Layland LE, Hoerauf A. Helminths and their implication in sepsis - a new branch of their immunomodulatory behaviour? *Pathog Dis*. 2013; 69: 127-141.

82. Abate E, Belayneh M, Gelaw A, Idh J, Getachew A, Alemu S, Diro E, Fikre N, Britton S, Elias D, Aseffa A, Stendahl O, Schön T. The impact of asymptomatic helminth co-infection in patients with newly diagnosed tuberculosis in north-west Ethiopia. *PLoS One*. 2012; 7: e42901.
83. Abate E, Belayneh M, Idh J, Diro E, Elias D, Britton S, Aseffa A, Stendahl O, Schön T. Asymptomatic helminth infection in active tuberculosis is associated with increased regulatory and Th-2 responses and a lower sputum smear positivity. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9: e0003994.
84. Elias D, Wolday D, Akuffo H, Petros B, Bronner U, Britton S. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol*. 2001; 123: 219-225.
85. Morawski BM, Yunus M, Kerukadho E, Turyasingura G, Barbra L, Ojok AM, DiNardo AR, Sowinski S, Boulware DR, Mejia R. Hookworm infection is associated with decreased CD4+ T cell counts in HIV-infected adult Ugandans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017; 11: e0005634.
86. Abossie A, Petros B. Deworming and the immune status of HIV positive pre-antiretroviral therapy individuals in Arba Minch, Chenchu and Gidole hospitals, Southern Ethiopia. *BMC Res Notes*. 2015; 8: 483.
87. Nacher M, Singhasivanon P, Yimsamran S, Manibunyong W, Thanyavanich N, Wuthisen R, Looareesuwan S. Intestinal helminth infections are associated with increased incidence of *Plasmodium falciparum* malaria in Thailand. *J Parasitol*. 2002; 88: 55-58.
88. Esen M, Mordmüller B, de Salazar PM, Adegnikaa AA, Agnandji ST, Schaumburg F, Hounkpatin AB, Brückner S, Theisen M, Bèlard S, Ngoa UA, Issifou

- S, Yazdanbakhsh M, Kremsner PG. Reduced antibody response against *Plasmodium falciparum* vaccine candidate antigens in the presence of *Trichuris trichiura*. *Vaccine*. 2012; 30: 7621-7624.
89. Kuschner E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardio*. 1985; 45: 249-56.
90. Ximenes CA. Técnica simplificada para o diagnóstico radiológico do megacolo chagásico. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1984; 17: 23.
91. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chéjade P, Puig L, Vergés M, Gascón J, Gómez i Prat J, Portús m, Sauleda S. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. *Acta Trop*. 2007; 103: 195-200.
92. Piron M, Vergés M, Muñoz J, Casamitjana N, Sanz S, Maymó RM, Hernández JM, Puig L, Portús M, Gascón J, Sauleda S. Seroprevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in at-risk blood donors in Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2008; 48: 1862-1868.
93. Bisoffi Z, Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M, Gobbo M, Bonafini S, Angheben A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Nutman TB. Diagnostic accuracy of five serologic tests for *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8: e2640.
94. Basile L, Jansà JM, Carlier Y, Salamanca DD, Angheben A, Bartoloni A, Seixas J, Van Gool T, Cañavate C, Flores-Chávez M, Jackson Y, Chiodini PL, Albajar-Viñas P, Working Group on Chagas Disease. Chagas disease in European countries: the Challenger of a surveillance system. *Euro Surveill*. 2011; 16: 19968.

95. Chammartin F, Scholte RG, Guimarães LH, Tanner M, Utzinger J, Vounatsou P. Soil-transmitted helminth infection in South America: a systematic review and geostatistical meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13: 507-518.
96. Buonfrate D, Mena MA, Angheben A, Requena-Méndez A, Muñoz J, Gobbi F, Albonico M, Gotuzzo E, Bisoffi Z; COHEMI Project Study Group. Prevalence of strongyloidiasis in Latin America: a systematic review of the literature. *Epidemiol Infect.* 2015; 143: 452-460.
97. Cancrini G, Bartoloni A, Paradisi F, Nuñez LE. Parasitological observations on three Bolivian localities including rural communities, cities and institutions. *Ann Trop Med Parasitol.* 1989; 83: 591-594.
98. Tanner S, Leonard WR, McDade TW, Reyes-García V, Godoy R, Huanca T. Influence of helminth infections on childhood nutritional status in lowland Bolivia. *Am J Hum Biol.* 2009; 21: 651-656.
99. Spinicci M, Macchioni F, Mantella A, Gabrielli S, Roselli M, Rojo Mayaregua D, Monasterio Pinckert J, Gamboa Barahona H, Paredes GA, Halkyer P, Cancrini G, Olliaro P, Montresor A, Bartoloni A. Seroepidemiological trend of strongyloidiasis in the Bolivian Chaco (1987-2013) in the absence of disease-specific control measures. *Trop Med Int Health.* 2017; 22: 1457-1462.
100. Ramos JM, León R, Andreu M, De las Parras Parras ER, Rodríguez-Díaz JC, Esteban A, Saugar JM, Torrús D. Serological study of *Trypanosoma cruzi*, *Strongyloides stercoralis*, HIV, human T cell lymphotropic virus (HTLV) and syphilis infections in asymptomatic Latin-American immigrants in Spain. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2015; 109: 447-453.
101. Valerio L, Roure S, Fernández-Rivas G, Basile L, Martínez-Cuevas O, Ballesteros AL, Ramos X, Sabrià M; North Metropolitan Working Group on

- Imported Diseases. *Strongyloides stercoralis*, the hidden worm. Epidemiological and clinical characteristics of 70 cases diagnosed in the North Metropolitan Area of Barcelona, Spain, 2003-2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2013; 107: 465-470.
102. Jackson Y, Santos L, Arm-Vernez I, Mauris A, Wolff H, Chappuis F, Getaz L. Prevalence of chronic infections and susceptibility to measles and varicella-zoster virus in Latin American immigrants. *Infect Dis Poverty.* 2016; 5: 41.
103. Salvador F, Sulleiro E, Sánchez-Montalvá A, Saugar JM, Rodríguez E, Pahissa A, Molina I. Usefulness of *Strongyloides stercoralis* serology in the management of patients with eosinophilia. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90: 830-834.
104. Buonfrate D, Sequi M, Mejia R, Cimino RO, Krolewiecki AJ, Albonico M, Degani M, Tais S, Angheben A, Requena-Mendez A, Muñoz J, Nutman TB, Bisoffi Z. Accuracy of five serologic tests for the follow up of *Strongyloides stercoralis* infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015; 9: e0003491.
105. Monteiro RV, Dietz JM, Raboy B, Beck B, De Vleeschouwer K, Baker A, Martins A, Jansen AM. Parasite community interactions: *Trypanosoma cruzi* and intestinal helminthes infecting wild golden lion tamarins *Leontopithecus rosalia* and golden-headed lion tamarins *L. chrysomelas* (Callitrichidae, L., 1766). *Parasitol Res.* 2007; 101: 1689-1698.
106. Rodríguez M, Terrazas LI, Márquez R, Bojalil R. Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* is modified by a previous non-related infection. *Parasite Immunol.* 1999; 21: 177-185.
107. Eschbach ML, Klemm U, Kolbaum J, Blankenhaus B, Brattig N, Breloer M. *Strongyloides ratti* infection induces transient nematode-specific Th2 response and reciprocal suppression of IFN-gamma production in mice. *Parasite Immunol.* 2010; 32: 370-383.

108. Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a Th2 phenomenon? *Immunol Today*. 1993; 14: 353-356.
109. Ortiz S, Zulantay I, Solari A, Bisio M, Schijman A, Carlier Y, Apt W. Presence of *Trypanosoma cruzi* in pregnant women and typing of lineages in congenital cases. *Acta Trop*. 2012; 124: 243-246.
110. Kaplinski M, Jois M, Galdos-Cardenas G, Rendell VR, Shah V, Do RQ, Marcus R, Pena MS, Abastoflor Mdel C, LaFuente C, Bozo R, Valencia E, Verastegui M, Colanzi R, Gilman RH, Bern C; Working Group on Chagas Disease in Bolivia and Peru. Sustained domestic vector exposure is associated with increased Chagas cardiomyopathy risk but decreased parasitemia and congenital transmission risk among young women in Bolivia. *Clin Infect Dis*. 2015; 61:918-926.
111. Murcia L, Carrilero B, Muñoz-Davila MJ, Thomas MC, López MC, Segovia M. Risk factors and primary prevention of congenital Chagas disease in a nonendemic country. *Clin Infect Dis*. 2013; 56: 496-502.

