

Prevalencia de la enfermedad Chagas-Mazza congénito y cumplimiento del algoritmo diagnóstico en las embarazadas



Director: Bqca. Lilitiana E. Pasí

Alumna: Alderete Contento Rocío Carolina

INDICE

Introducción.....	3
Epidemiología.....	4
Fisiopatología.....	4
Manifestaciones clínicas.....	5
Diagnóstico.....	5
DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO EN CHAGAS CONGÉNITO.....	7
Técnica Tubo Capilar.....	8
Técnica Microtubo.....	8
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO EN CHAGAS.....	11
Hemaglutinación Indirecta (HAI).....	11
Prueba inmunoenzimática (ELISA).....	18
Materiales y métodos.....	22
Resultados.....	22
Discusión.....	26
Bibliografía.....	27

Introducción

La enfermedad de Chagas-Mazza es poscolombina. Si bien el *Triatoma* infestan o vinchuca (vector) es conocido desde el siglo XVI, la epidemia recién se dispersa después de las conquistas hispano-portuguesas con el desplazamiento de poblaciones, la apertura de nuevas y múltiples fronteras agrícolas y la acentuación del desequilibrio social que permitieron el contacto entre el vector y el huésped. En 1909 el ilustre investigador brasileño el Dr. Carlos Chagas comunica el descubrimiento de la nueva tripanosomiasis humana. Posteriormente en 1911 obtiene el primer registro de enfermedad chagásica congénita. En 1949 Aldao en Venezuela describe el hallazgo del *Trypanosoma cruzi* en sangre periférica en un recién nacido de dos días de vida. En nuestro país en el año 1924 Mühlens Dios, Petrocchi y Succarini comunican los dos primeros casos de Chagas Agudo. A partir de 1926 Salvador Mazza desde la Misión de Estudios de Patología Regional Argentina (Jujuy) realizó intensas investigaciones que revaloraron los trabajos de Carlos Chagas, justificando que su nombre se asocie al de aquel en la nominación de la enfermedad, produciéndose como un renacimiento de la misma. El primer caso en nuestro país de Chagas Congénito fue descrito por Jorge y Romaña en el año 1953. En un principio se pensó que la enfermedad de Chagas Congénita producía importantes manifestaciones clínicas, pero en la década del 70 se demostró que la mayoría de los recién nacidos con infección congénita son asintomáticos. En 1976 Howard y en 1983 Moya, comunicaron la eficiencia de diferentes agentes parasiticidas y que el éxito terapéutico está en relación directa con el inicio precoz del tratamiento.

La enfermedad de Chagas-Mazza o *Trypanosomiasis cruzi* americana es una infección hística y hemática producida por el protozoo flagelado hematófago *T. cruzi* que anida y se reproduce en los tejidos. Esta infección es transmitida por insectos hematófagos siendo el más frecuente en nuestro país el triatoma infestans conocido como “vinchuca”. La infección se facilita cuando las condiciones ecológicas son favorables para la entrada o permanencia de los triatomas infectados en las viviendas humanas principalmente en el medio rural.

Es una zoonosis endémica en América, afectando a nuestro país desde el norte hasta el Río Colorado, respetando, aunque no totalmente, áreas urbanas que no están libres de infectados chagásicos por las migraciones poblacionales. En la Argentina se calculan alrededor de tres millones de infectados, aunque estos datos están subevaluados por falta de estadísticas fidedignas.

Dado su inicio en la infancia (etapa aguda), su curso silencioso (etapa inaparente) y su larga evolución durante más de treinta años (etapa crónica), esta enfermedad pasa inadvertida por no tener síntomas hasta que sobreviene las alteraciones cardíacas. El control de la enfermedad contempla la interrupción de la transmisión del parásito al hombre y la atención médico social del individuo ya infectado. Debido a la posibilidad de transmisión perinatal es mandatorio realizar serología para Chagas y poder detectar precozmente la enfermedad en el recién nacido, con la posibilidad de tratamiento de Chagas agudo que implica curación.

Epidemiología

En el Chagas Congénito la transmisión placentaria depende directamente de dos indicadores epidemiológicos básicos:

1. La tasa de prevalencia de la infección chagásica en mujeres embarazadas.
2. La incidencia de la transmisión vertical.

Es una afección parasitaria, sistémica, crónica, transmitida por vectores y causante de una epidemia que afecta a todo el continente americano y que, a partir de fenómenos migratorios, se ha diseminado a países de Europa y Asia.

En el año 2016 la Organización Mundial de la Salud elaboró el Plan de acción para la eliminación de las enfermedades infecciosas desatendidas y las medidas posteriores a la eliminación 2016-2022; en él se abordan principalmente la vigilancia, la atención, el control y la eliminación de varias enfermedades entre las cuales se destaca Chagas. Tiene una incidencia anual de 30.000 casos vectoriales en la región de las Américas y 9.000 recién nacidos infectados durante el embarazo, la enfermedad de Chagas afecta a unos 6 millones de personas y provoca, en promedio, alrededor de 14.000 muertes al año. (Organización Panamericana de la Salud • www.paho.org/chagas • OPS/OMS, 2017). La OMS afirma que el diagnóstico de la infección en las embarazadas, sus recién nacidos y los hermanos es esencial.

Las últimas estimaciones de casos (OPS, 2006) indican que en Argentina habría 7.300.000 personas expuestas, 1.600.000 infectadas y más de 300.000 afectadas por cardiopatías de origen chagásico. La seroprevalencia de infección por *T. cruzi* en embarazadas en el país fue de 6,8 % en 2000, de 4,84% en 2010 y de 2,06% para 2018, (INCOSUR; 2018). En base a estos datos, se estima que cada año nacen 1.300 niños infectados por transmisión congénita. Cabe consignar que 9/10 niños tratados en fase aguda y 7/10 tratados en fase crónica se curan. La prevalencia media de infección por *T. cruzi* en niños menores de 14 años fue de 1,5% en 2009.

La mayoría de las embarazadas infectadas no presenta signos o síntomas atribuibles a la enfermedad de Chagas dado que las manifestaciones clínicas suelen observarse luego de la edad fértil. La infección vectorial en zonas endémicas tiene un fuerte impacto en el niño durante los primeros meses y años de vida, existiendo generalizado acuerdo en que la mayoría de los nuevos casos ocurren en edades pediátricas.

Fisiopatología

El *Trypanosoma cruzi* produce en el huésped una infección persistente por lo cual el parásito puede encontrarse en sangre periférica en la fase aguda como en la crónica de la enfermedad siendo el riesgo de transmisión mayor en la fase aguda ya que la parasitemia es intensa. Para que exista infección transplacentaria por *T. cruzi* debe existir parasitemia. El parásito por vía hemática puede infectar al feto con o sin compromiso placentario; infectar la placenta sin compromiso fetal o, puede no afectar la placenta y no producir infección fetal. Algunos autores sostienen que debe producirse una lesión previa en el trofoblasto para que se produzca el pasaje del *T. cruzi*, aunque hay estudios que demuestran la transmisión congénita sin lesión trofoblástica. La infección fetal puede producirse tanto en etapas tempranas o tardías de la gestación, no existiendo ningún período exento del riesgo.

Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Chagas Congénito tiene dos formas de presentación:

- Asintomática (corresponde a la gran mayoría de los pacientes).
- Sintomática (que puede ser precoz o tardía según aparecen los síntomas antes o después de los treinta días de vida).

Las manifestaciones clínicas varían desde niños prematuros con importantes sintomatologías hasta niños de término asintomáticos. Los niños pueden presentar compromiso del estado general, palidez, ictericia, hipotonía muscular, fiebre, hepatomegalia y esplenomegalia. La hepatomegalia constituye el signo más importante de la enfermedad y su persistencia puede ser mayor en la evolución natural de la enfermedad, desapareciendo en aquellos casos no tratados entre los seis meses y el año de edad. Hepatomegalia y/o esplenomegalia se constituyen en elementos importantes de sospecha de enfermedad de Chagas en lactantes, sobre todo cuando los antecedentes epidemiológicos son positivos (madre chagásica, transfusiones previas y zona endémica).

En casos aislados se presenta compromiso cardíaco. La taquicardia es uno de los hallazgos que cuando se presenta lo hace en forma persistente, pudiendo ser la misma, testimonio de miocarditis chagásica. Los hallazgos en el electrocardiograma están referidos a aplanamiento de la onda T, desplazamiento del segmento ST, disminución del voltaje de los complejos y alargamiento del tiempo de conducción.

El compromiso del sistema nervioso central como encefalitis y meningitis son un importante componente de la infección aguda en niños. Es difícil establecer el grado de compromiso, así como la localización de las lesiones tisulares sólo a través de las manifestaciones clínicas en los primeros meses de vida. Se han descrito calcificaciones cerebrales en el 30% de los infectados y el nacimiento de niños con signos de daño intrauterino temprano con microcefalia.

Las alteraciones hematológicas como anemia hipocrómica microcítica de grado variable y leucocitosis han sido descritas por la mayoría de los autores. La hiperbilirrubinemia de hallazgo frecuente en el período neonatal ha sido documentada en pacientes infectados y existen descripciones de elevaciones importantes que requirieron terapia con exanguinotransfusión.

Diagnóstico

Debe intentarse la identificación del microorganismo causante de la infección. Si no es posible el aislamiento del agente etiológico, la alternativa es el inmunodiagnóstico.

Detección del parásito

- a) Métodos directos
 - Examen en fresco
 - Gota gruesa
 - Método de concentración de Strout
 - Microhematocrito
 - Microtubo

- b) Métodos indirectos

- Hemocultivo
- Xenodiagnóstico
- Inmunodiagnóstico
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
- Aglutinación directa (AD)
- Hemoaglutinación indirecta (HAI)
- Fijación de complemento (FdC)
- ELISA

En el adulto se detecta la infección por medio de inmunodiagnósticos. En la mayoría de los casos de infección chagásica congénita se detecta el parásito en sangre de los neonatos y lactantes infectados. El neonato chagásico desde el punto de vista parasitológico se comporta como un infectado agudo, ya que presenta generalmente parasitemia detectable, en cambio desde el punto de vista inmunológico su papel es comparable al que presentan los enfermos crónicos, debido a la presencia de anticuerpos inmunoglobulina G, (IgG) proveniente de la madre. Debe tenerse en cuenta que los recién nacidos chagásicos son con frecuencia asintomáticos al igual que sus madres. Por esto siempre deben detectarse a las madres con infección crónica o inaparente.

La importancia de un correcto diagnóstico estriba en que el neonatólogo o pediatra se le presenta una de las oportunidades únicas de curación definitiva del infectado chagásico. Una vez detectada la infección en la madre (serología positiva confirmada por dos métodos diferentes), se inician los estudios en el recién nacido con parasitemia mediante la técnica del microhematocrito. Un resultado positivo confirma, pero un negativo no descarta. Si el estudio parasitológico es positivo se inicia tratamiento inmediato. Si el primer estudio parasitológico es negativo, se realiza un nuevo control durante el primer mes de vida. Si aún no se detectan parásitos se realiza control serológico a los seis meses. La positividad de este estudio, aún con parasitemias negativas, confirman el diagnóstico ya que los anticuerpos maternos presente en la sangre del niño desaparecen antes de los seis meses. El diagnóstico serológico debe realizarse por ejecución paralela, a más de una prueba con diferentes métodos para aumentar la especificidad del diagnóstico. El seguimiento parasitológico del neonato en tratamiento se realiza en forma semanal hasta su negativización, que se produce alrededor de los 15-20 días, cuando se administra adecuadamente la medicación y la cepa es sensible al fármaco. En el seguimiento serológico se tomará una muestra al finalizar el tratamiento. Luego cada tres meses hasta observar negativización serológica en dos controles sucesivos.

Métodos de diagnóstico

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas se produce cuando el parásito pasa de la madre al niño durante el embarazo. El niño con Chagas congénito al nacer se encuentra en la fase aguda de la enfermedad, con una parasitemia detectable por métodos parasitológicos en la mayoría de los casos. Una característica especial de este tipo de transmisión es que los niños al nacer, aparte de tener una parasitemia detectable, también tendrán anticuerpos de tipo IgG específicos contra el *T. cruzi* los cuales provienen de la madre. Las inmunoglobulinas de tipo IgG maternas que atraviesan la placenta, también se encontrarán en todo niño nacido de madre positiva para Chagas sea o no congénito. Por este motivo no pueden utilizarse las técnicas serológicas para el diagnóstico de Chagas en niños menores de 6 meses de edad. Entre 6 y 12 meses, se pueden utilizar esas técnicas, interpretando el resultado como indica la norma.

Para el diagnóstico de Chagas congénito se debe:

- Realizar una prueba serológica a la madre.

Si la serología materna es positiva:

- Realizar un examen parasitológico al nacimiento, y un control parasitológico antes de los 6 meses de edad.

- Realizar un examen serológico a partir de los 6 meses de edad ya que es importante realizarlo a todo recién nacido de madre con serología positiva para Chagas.

DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE CHAGAS CONGÉNITO

El diagnóstico parasitológico de la Enfermedad de Chagas congénita se basa en técnicas que ponen en evidencia al parásito circulante en sangre periférica. Esta detección es relativamente fácil al nacimiento, ya que los bebés con Chagas congénito se encuentran en la fase aguda de la enfermedad en la cual la parasitemia es elevada en la mayoría de los casos.

Las técnicas parasitológicas directas que pueden realizarse son: *el examen en fresco, la gota gruesa, extendido, Strout y microstrout, y actualmente la técnica del microtubo es la más recomendada*. La sensibilidad de los métodos parasitológicos directos es variable.

La técnica del tubo capilar presenta las siguientes ventajas respecto a los otros métodos parasitológicos directos:

-) Elevada sensibilidad (similar al método de Strout).
-) Requiere un volumen reducido de muestra de sangre (200 µl), por lo tanto, puede ser aplicado a recién nacidos y niños de corta edad.
-) Bajo costo, no requiere equipo sofisticado.
-) Metodología sencilla.
-) Rápido, los resultados son emitidos en aproximadamente 30 minutos.

Si bien presenta todas estas ventajas, utilizaremos la técnica del microtubo pues su sensibilidad es mayor (99%) y no tiene el inconveniente en cuanto a la bioseguridad ya que los capilares al cortarse pueden producir accidentes en el operador, por otro lado si los mismos se observasen directamente muchas veces es tedioso poder observar en la interfase al parásito.

Técnica Tubo Capilar

PRINCIPIO DE LA TÉCNICA

Es una técnica de concentración de parásitos, basada en la estratificación de las células sanguíneas de acuerdo a su densidad por acción de la fuerza centrífuga. La sangre es colocada en tubos capilares heparinizados y centrifugada a gran velocidad (8000 a 12000 rpm) durante 5 minutos. Después de la centrifugación, podemos observar en el tubo capilar:

-) Los glóbulos rojos que están concentrados en la parte inferior del tubo. (GR).
-) Un pequeño anillo blanquecino (capa lechosa o buffy coat) de aproximadamente 1 a 1.5 mm de altura constituido por los glóbulos blancos (GB).
-) Una columna líquida: el plasma. (P)
-) Los tripanosomas se encuentran en la interfase entre los glóbulos blancos y el plasma.

Límite de detección de la técnica del tubo capilar

La determinación del límite de detección de la técnica fue realizada utilizando sangre humana experimentalmente infectada con trypomastigotes. Con esta técnica se ha visto que cuando la carga parasitaria es de 40 parásitos/ml, al menos un tubo capilar de los cuatro tubos observados es positivo, mientras que los cuatro tubos son sistemáticamente positivos cuando las parasitemias son mayores o iguales a 100 parásitos/ml.

Muestras

Indistintamente podemos utilizar:

- Sangre de cordón umbilical (tomada en tubo heparinizado) para la detección de Chagas congénito.
- Sangre capilar o venosa (4 o más tubos capilares heparinizados),

Materiales y equipos

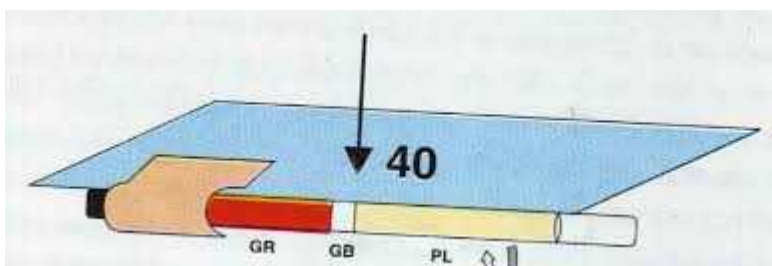
- Tubos capilares heparinizados.
- Plastilina.
- Centrifuga para microhematocrito.
- Microscopio óptico (objetivo 40x).
- Portaobjetos preparado como soporte para tubos capilares

PROCEDIMIENTO:

- ✓ Llenar al menos 4 tubos capilares heparinizados con la sangre venosa, capilar o de cordón, teniendo cuidado de llenarlos al menos hasta las tres cuartas partes de cada uno de ellos.
- ✓ Sellar cuidadosamente, con plastilina, cada uno de los tubos, de preferencia por el extremo del tubo que fue utilizado para el llenado.
- ✓ Centrifugar los tubos capilares en una centrífuga de microhematocrito (8.000-10.000 r.p.m.) por 5 minutos.
- ✓ Sacar los tubos capilares de la microcentrífuga y colocarlos en posición vertical hasta el momento de la lectura.

LECTURA DE LOS RESULTADOS:

- ✓ Realizar la lectura utilizando un soporte fabricado en el laboratorio que consiste en un portaobjetos corriente al cual se le ha pegado, por sus dos caras y en uno de sus bordes laterales mayores un papel pegante (masking tape), dejando un pequeño espacio entre el borde del portaobjetos y las dos caras del papel que sirve para introducir uno de los extremos del tubo capilar.
- ✓ Para la lectura colocar el tubo en el espacio dejado entre el papel pegante y el borde lateral del portaobjeto del soporte fabricado.
- ✓ Llevar el soporte y el tubo capilar al microscopio, enfocar la región de la línea divisoria de la capa lechosa del Buffy coat (Glóbulos blancos y plaquetas) y el plasma sanguíneo con el objetivo 10 X.
- ✓ Observar minuciosamente esta región con el objetivo 40 X, haciendo rotar el tubo en un ángulo de 45°, hasta observar la totalidad de la circunferencia del tubo capilar.
- ✓ Proceder a la lectura de los tubos capilares restante con la metodología indicada.



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Se diagnostica como POSITIVO cuando se detectan una o más formas de tripomastigotes móviles activos que se disponen en la región divisoria de la capa lechosa (paquete globular o Buffy coat) y el plasma sanguíneo en uno o más de los cuatro tubos capilares. “Los tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* son detectados por su movimiento característico y no así por su morfología”.

Cuantificación de la parasitemia

La estimación de la parasitemia en la técnica del tubo capilar se realiza sólo con el fin de conocer la parasitemia de los casos de Chagas congénito y su relación con la sintomatología y no así con fines de diagnóstico porque la presencia de un solo parásito en uno de los tubos capilares confirma el diagnóstico de Chagas Congénito. Para la estimación de la parasitemia utilizamos la tabla siguiente:

Parásitos/tubo capilar	Concentración de Parásitos en cruces
1 – 5	+
6 – 10	++
11 – 30	+++
> 30	++++

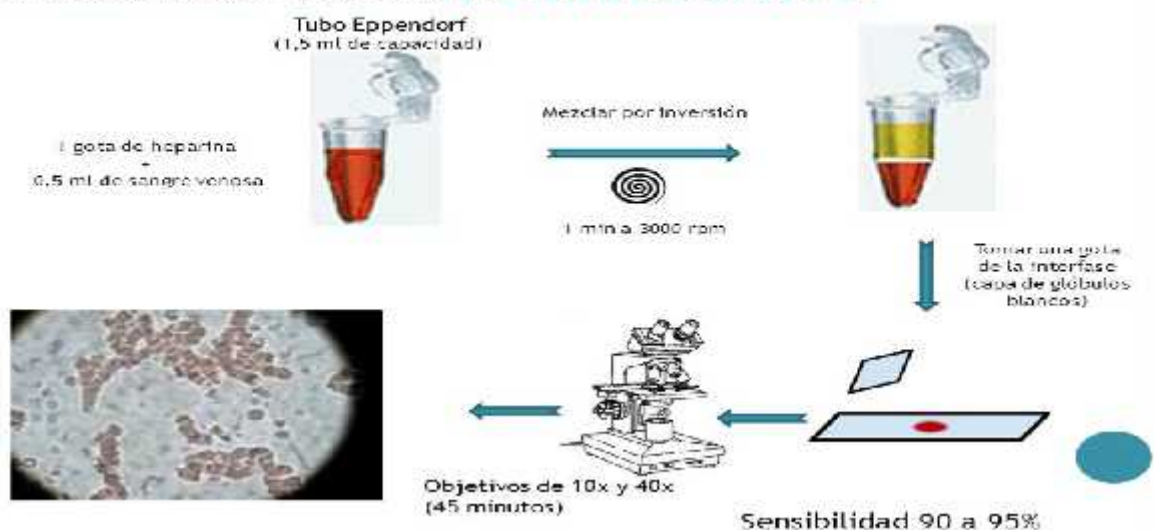
Causas de error

Las plaquetas constituyen la causa más frecuente de error produciendo falsos positivos, ya que se disponen a nivel de la línea divisoria del Buffy coat (paquete globular) y el plasma al igual que los parásitos. Las plaquetas presentan un movimiento vibratorio característico (movimiento “browniano”) y no un movimiento de traslación.

Técnica del Microtubo

Consiste en obtener 0,5 ml aproximadamente de sangre anticoagulada con heparina o EDTA, en un ependorf el cual posteriormente se centrifuga a 1500 rpm durante 1 minuto. Luego se tomade la interfase con micropipeta automática o pipeta Pasteur 3-6 gotas las cuales se observan entre porta y cubre para ver la presencia o no del parásito.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO- ETAPA AGUDA MÉTODOS PARASITOLÓGICOS- NUEVO MICROMÉTODO



DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE CHAGAS CONGENITO

1. *Hemaglutinación indirecta (HAI)*

FUNDAMENTO: Es una técnica que se basa en la detección de anticuerpos aglutinantes específicos anti *T. cruzi* presentes en los sueros de enfermos con Chagas. El antígeno soluble de *T. cruzi* es fijado a la superficie de glóbulos rojos tanados capaces de absorber antígenos parasitarios y que de esta manera están “sensibilizados”. Al poner en contacto el suero en estudio, con los glóbulos rojos sensibilizados, si existen anticuerpos contra el *T. cruzi*, se formará una malla de glóbulos rojos-anticuerpos-glóbulos rojos, que al precipitar formará una capa fina de color rojo tenue que ocupará todo el fondo del pocillo donde se realizó la reacción. Si no existen anticuerpos, los glóbulos rojos sensibilizados sedimentarán formando un solo conglomerado puntiforme de color rojo intenso.

En los sueros de algunas personas no infectadas por *T. cruzi* se encuentran globulinas (o anticuerpos) que pueden reaccionar con antígenos de los glóbulos rojos dando lugar a falsos positivos. Estos anticuerpos o globulinas inespecíficas se llaman anticuerpos inespecíficos o heterófilos. La heterofilia es detectada estudiando cada suero a una dilución baja (1/8) con hematíes no sensibilizados.

El 2 Mercapto Etanol (2ME) que es incorporado en algunos kits comerciales, es de utilidad para discriminar la reactividad inespecífica (falsos positivos).

La prueba de HAI se realiza en tres etapas:

Primera etapa

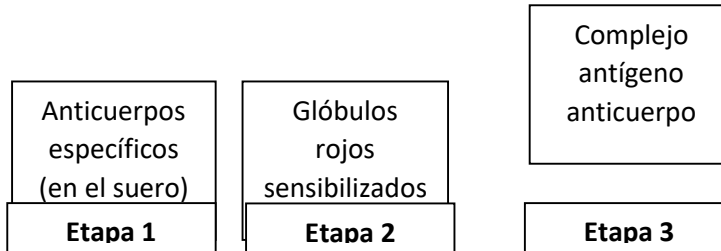
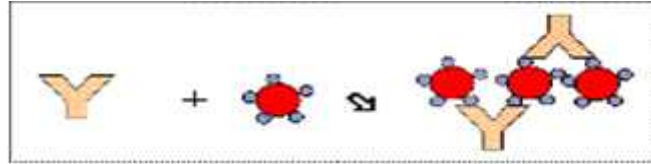
- Se coloca una muestra de suero del paciente a la dilución determinada en un pocillo de la placa de micro titulación de poliestireno de 96 pocillos con fondo en U (o en V dependiendo del kit).

Segunda etapa

- Se añaden los glóbulos rojos sensibilizados con antígeno de *T. cruzi*.

Tercera etapa

- Lectura de los resultados, se observa la aglutinación o ausencia de aglutinación de los glóbulos rojos (reacción positiva o reacción negativa respectivamente).



MATERIALES

Reactivos Los kits comerciales de Hemaglutinación Indirecta, básicamente tienen los siguientes reactivos y materiales:

- ✓ Antígeno Hematíes sensibilizados con Ag de *T. cruzi*. Los glóbulos rojos sensibilizados se encuentran sedimentados al fondo del frasco, estos deben ser puestos en suspensión por medio de una agitación suave antes de utilizarlos. Listo para su uso.
- ✓ Hematíes no sensibilizados, para control de heterofilia. Agitar suavemente antes de su uso. Listo para su uso.
- ✓ Solución proteica Albúmina Sérica Bovina (BSA), estabilizada con conservantes.
- ✓ Diluyente de la muestra Solución salina isotónica con absorbentes y conservantes.
- ✓ Control positivo y negativo.
- ✓ Policubetas de hemaglutinación de fondo en U o en V de 96 pocillos. Las policubetas deben estar limpias, no deben estar rayadas ni cargadas electrostáticamente, para evitar esto último se recomienda pasar con un papel secante húmedo por la base de la placa antes de iniciar el proceso. Las mismas NO PUEDEN REUTILIZARSE.

Muestras

Suero o plasma de pacientes obtenido según técnicas establecidas.

Insumos y equipos

Pipetas automáticas de capacidad de 10, 20 y 200 μ l. de volumen variable.

Pipeta multicanal de capacidad de 100 μ l. de volumen variable (opcional).

Puntas para pipetas y Caja de puntas.

Microtubos para congelar sueros.

Gradillas para tubos y microtubos.

PROCEDIMIENTO:

Preparar el protocolo de trabajo según el modelo con las siguientes características: ubicación en la placa del código de la muestra y de la dilución (1/8 hasta 1/64) que se desea investigar, sin olvidar los controles positivo y negativo.

	(+)	(-)	m1	m2	m3								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1/8 A													
1/16 B													
1/32 C													
1/64 D													
E													
F													
G													
H													

(+) control positivo

(-) control negativo

m1, m2, m3... muestra de los pacientes

Paso 1: Preparación del diluyente de la muestra

- Utilizando el diluyente de la muestra, hacer una dilución de la solución proteica de 1/20, es decir colocar 950 μ l diluyente y 50 μ l. de solución proteica. Preparar la cantidad necesaria para el día; una vez preparado el diluyente puede ser conservado por 2 a 3 días a 4 °C. Tenga en cuenta que, por cada muestra, se utilizan aproximadamente 150 μ l de diluyente.

- Colocar en los primeros pocillos (1A, 2A, 3A...) 70 μ l. de diluyente de muestra (ya preparado) utilizando una micropipeta calibrada.

- Colocar 25 μ l. de diluyente de muestra a los siguientes pocillos, hasta la dilución (título) que se desea investigar (1B - 1D).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
70 μ l	1/8 A												
25 μ l	1/16 B												
25 μ l	1/32 C												
25 μ l	1/64 D												
	E												
	F												
	G												
	H												

Paso 2: Dilución de la muestra

- Colocar 10 μ l. de la muestra problema (suero o plasma) o de los controles al primer pocillo (1A, 2A, 3A ...) (dilución 1/8).

- Con una pipeta calibrada para 25 μ l, homogeneizar la muestra. Transferir 25 μ l a la fila siguiente y repetir la misma operación hasta la dilución deseada (dilución 1/16, 1/32, 1/64, etc.) desechando los últimos 25 μ l.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
10 μ l suero	1/8 A	○	○	○	○	○							
25 μ l	1/16 B	○	○	○	○	○							
25 μ l	1/32 C	○	○	○	○	○							
25 μ l	1/64 D	○	○	○	○	○							
Desechar 25 μ l	E												
	F												
	G												
	H												

Paso 3: Inicio de la reacción con los glóbulos rojos no sensibilizados y el antígeno

- Agitar bien los frascos de hematíes no sensibilizados y Antígeno (hematíes sensibilizados).
- Depositar 25 μ l de Hematíes no sensibilizados al pocillo 1A, 2A, 3A... (dilución 1/8).
- Depositar 25 μ l de antígeno a cada uno de los restantes pocillos 1B, 1C, 1D, 2B, 2C, 2D... (dilución 1/16 hasta 1/64 o superior).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
25 μ l hematíes No sensib.	1/8 A	●	●	●	●	●							
25 μ l Ag	1/16 B	●	●	●	●	●							
25 μ l Ag	1/32 C	●	●	●	●	●							
25 μ l Ag	1/64 D	●	●	●	●	●							
	E												
	F												
	G												
	H												

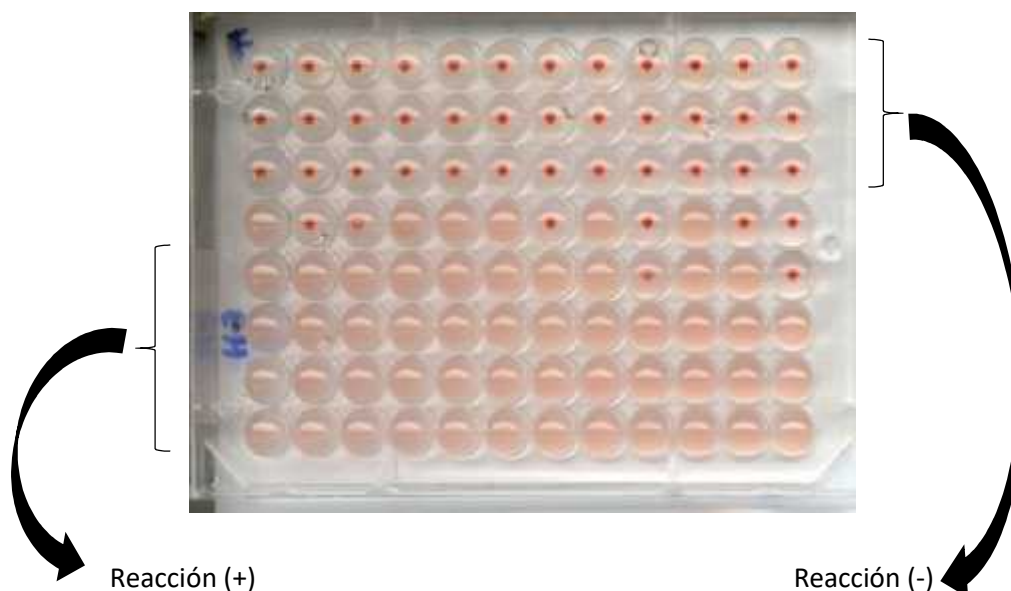
- Agitar la placa golpeando con los dedos sobre sus paredes laterales durante 30 segundos.
- Tapar la placa para evitar evaporación y contaminación.

- Dejar la placa en reposo evitando vibraciones o movimientos bruscos, que pueden dar lugar a reacciones falsas negativas.

- Leer después de 2 horas de incubación.

LECTURA DE LOS RESULTADOS:

- Reacción positiva formación de un manto de aglutinación rojo tenue debido a la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Por convención se considera positiva la reacción que cubre más del 50% del fondo del pocillo.
- Reacción negativa formación de un botón nítido rojo intenso y puntiforme, debido a la sedimentación de los glóbulos rojos sensibilizados (antígeno).
- Reacción indeterminada la formación del botón no es nítida o cuando el manto ocupa menos del 50% del espacio del pocillo.



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Para interpretar el resultado de la hemaglutinación, es necesario tomar en cuenta y anotar el título o la última dilución a la que el suero sigue siendo positivo.

La técnica de hemaglutinación descrita con anterioridad corresponde a un HAI cuantitativo donde se pretende determinar el título de anticuerpos dado por la última dilución a la cual la muestra da un manto. El HAI puede ser cualitativo, utilizando una sola dilución del suero o muestra, generalmente la dilución de 1/16, obteniéndose un resultado cualitativo positivo o negativo.

Mujer gestante (control prenatal o en el momento del parto)

- HAI Negativo, mujer embarazada no infectada. Repetir la serología en cada embarazo.
- HAI = ó $> 1/16$: Se considera positiva (reactiva) toda muestra que presente un HAI superior o igual a $1/16$.

Control del niño de 6 a 12 meses de edad

Para este control el médico debe mencionar en la solicitud de laboratorio: “HAI Chagas cuantificado” que significa que el laboratorio procesará el suero hasta la máxima dilución. El resultado es interpretado de la siguiente manera:

- HAI Negativo, Niño no infectado.
- HAI $1/16$, $1/32$, $1/64$: Es necesario un control serológico cuantificado 3 meses después para estudiar la evolución del título.
- HAI $> 1/128$: Positivo, comunicar el resultado al pediatra inmediatamente para el inicio del tratamiento especificando la última dilución. Confirmar además el resultado con una 2ª técnica (ELISA).

Control del niño tratado (6 meses postratamiento)

- HAI Negativo: Niño curado.
- HAI Positivo: Se recomienda esperar 3 meses más para realizar una nueva prueba cuantificada y comparar con el anterior resultado. Si es positiva, pero se observa descenso de anticuerpos respecto al primer control, se considera que el niño está en fase de curación. En este caso deberá esperarse otros 3 meses para comprobar la negativización serológica. Si el título de anticuerpos ha subido, se tienen dos situaciones:

* Fracaso terapéutico por tratamiento incompleto o fallas durante su administración, por lo que se debe repetir el tratamiento.

* Son anticuerpos propios del lactante debido a una reinfección por lo que debe considerarse un nuevo tratamiento.

El descenso del título de anticuerpos es el parámetro que nos indica la efectividad del tratamiento y/o la eliminación de los anticuerpos maternos.

En niños mayores de un año, la negativización serológica es más lenta, por tanto, se recomienda esperar 12 meses para hacer el control postratamiento y repetir anualmente hasta comprobar la curación del paciente.

2. Prueba inmunoenzimática (ELISA)

La prueba de ELISA, dentro del subcomponente de Chagas congénito, se utilizará para la confirmación serológica de los casos positivos de niños mayores a seis meses, y de madres que vayan a iniciar el tratamiento.

FUNDAMENTO: Se basa en una reacción antígeno-anticuerpo específica de *T. cruzi* que se realiza en un soporte o fase sólida. Este complejo es detectado mediante una anti gammaglobulina humana marcada con una enzima (conjugado), cuya presencia es a su vez revelada, por un sustrato específico para la enzima y una sustancia cromógena que es normalmente incolora pero que en contacto con la sustancia producida por la reacción enzimática tiene la capacidad de colorearse. La intensidad del color es proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en la muestra.

COMPONENTES DE LA PRUEBA:

- ✓ Fase sólida: Constituida por las placas de microtitulación producidas en poliestireno transparente, material capaz de adsorber el antígeno o anticuerpo usado en la prueba, tiene 96 pocillos.
- ✓ Antígeno: Son fracciones de *T. cruzi*, preparadas especialmente para reducir la posibilidad de reacciones cruzadas.
- ✓ Conjugado o anti gammaglobulina humana: Se compone de gammaglobulina producida en carnero u otro animal que reconoce los anticuerpos (inmunoglobulinas) humanas presentes en el suero humano y se une a él. La anti gammaglobulina está unida a una enzima (fosfatasa alcalina o peroxidasa).
- ✓ Enzima: Fosfatasa alcalina o peroxidasa.
- ✓ Sustrato: Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).
- ✓ Cromógeno: Ortofenilendiamina (OPD) o Tetrametilbencidina (TMB), etc.
- ✓ Solución de bloqueo: HCl, NaOH o H₂SO₄

PROCESAMIENTO:

Antes de iniciar el procesamiento de las muestras se debe registrar en la hoja de trabajo (protocolo) las condiciones de trabajo y la ubicación de los sueros tanto controles como muestras problemas.

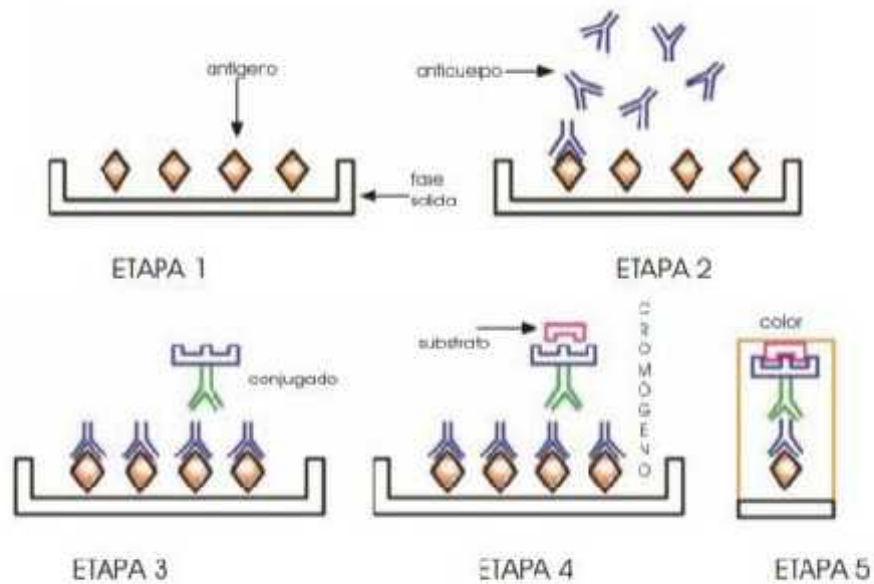


Fig. 11. Representación del fundamento de una prueba de ELISA

Primera Etapa

Los antígenos de *T. cruzi* son adsorbidos en la fase sólida (normalmente, en los kits comerciales esta etapa ya fue realizada en la fábrica, la placa ya está sensibilizada (coating) y lista para su uso.

Segunda etapa

- ✓ Diluir, siguiendo las instrucciones del kit, cada una de las muestras en estudio y los sueros controles positivos y negativos.
- ✓ Añadir el volumen indicado de muestra diluida, en los pocillos (uno por cada muestra estudiada).
- ✓ Cubrir la placa con parafilm.
- ✓ Incubar la placa por el tiempo especificado en la estufa de incubación. En el primer pocillo de la placa (A 1) se coloca simplemente la cantidad indicada de tampón, sin ninguna muestra, este pocillo servirá como blanco en el momento de la lectura. Si la muestra es reactiva, es decir contiene anticuerpos específicos contra *T. cruzi*, estos se unen de manera específica a los antígenos de la placa de microtitulación. Pasado el tiempo de incubación, se desecha el contenido de los pocillos por inversión enérgica de la placa y se procede al lavado de la misma por tres veces con 200µl de tampón de lavado por pocillo (o como indiquen las instrucciones del kit).

Tercera etapa

- ✓ Añadir, en cada uno de los pocillos, el volumen indicado de conjugado (anti gammaglobulina humana marcada con una enzima) previamente diluido según las instrucciones del kit.
- ✓ Cubrir herméticamente la placa y llevarla a incubación por el tiempo especificado.
- ✓ Proceder al vaciado y lavado de la placa como en el paso anterior.
- ✓ En esta etapa ocurre la unión entre el anticuerpo del conjugado y los anticuerpos de la muestra.

Cuarta etapa

- ✓ Preparar, siguiendo las instrucciones del Kit, el sustrato y añadir la cantidad indicada en cada uno de los pocillos.
- ✓ Incubar la placa según las indicaciones del kit el tiempo especificado.
- ✓ En esta etapa, el sustrato en contacto con la enzima, se oxidará, dando lugar a la formación de un producto de diferente color según el tipo de cromógeno utilizado. El cambio de color de la solución indica una reacción positiva.
- ✓ Si la muestra no tiene anticuerpos contra el T. cruzi, no habrá reacción y por lo tanto no se producirá color.

Quinta etapa

Agregar (sin vaciar la placa) la solución de bloqueo para interrumpir la reacción de la enzima sobre el sustrato, para que no se generen falsos positivos.

Sexta etapa

Llevar la placa al lector ELISA, utilizando el filtro especificado en las instrucciones del kit.

En este paso se puede programar el lector ELISA para que reste automáticamente la absorbancia del blanco de todos los valores (la absorbancia del blanco corresponde a la reactividad inespecífica).

El resultado de la reacción se da por la lectura de la absorbancia de la muestra o densidad óptica (DO), cuanto más intenso es el color producido por la reacción, mayor será el valor de la absorbancia.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Cada kit comercial indica cómo calcular el valor del cut off (punto de corte), en base a los valores de los controles positivos y negativos, por encima o por debajo de este valor las muestras son consideradas positivas o negativas.

Las muestras indeterminadas o dudosas son aquellas que están incluidas en la zona próxima (borderline) al valor del cut off y no se puede tener certeza del resultado.

El cut off se calcula usando los valores de absorbancia de los pocillos, correspondientes a los controles positivos bajos y de los controles negativos.

Un suero será positivo cuando su absorbancia sea mayor que el valor del cut off, un suero será negativo cuando su absorbancia sea menor que el valor del cut off.

Si la absorbancia del suero está en el valor del cut off +/- 10%, repetir la prueba, para esa muestra.

Materiales y Métodos

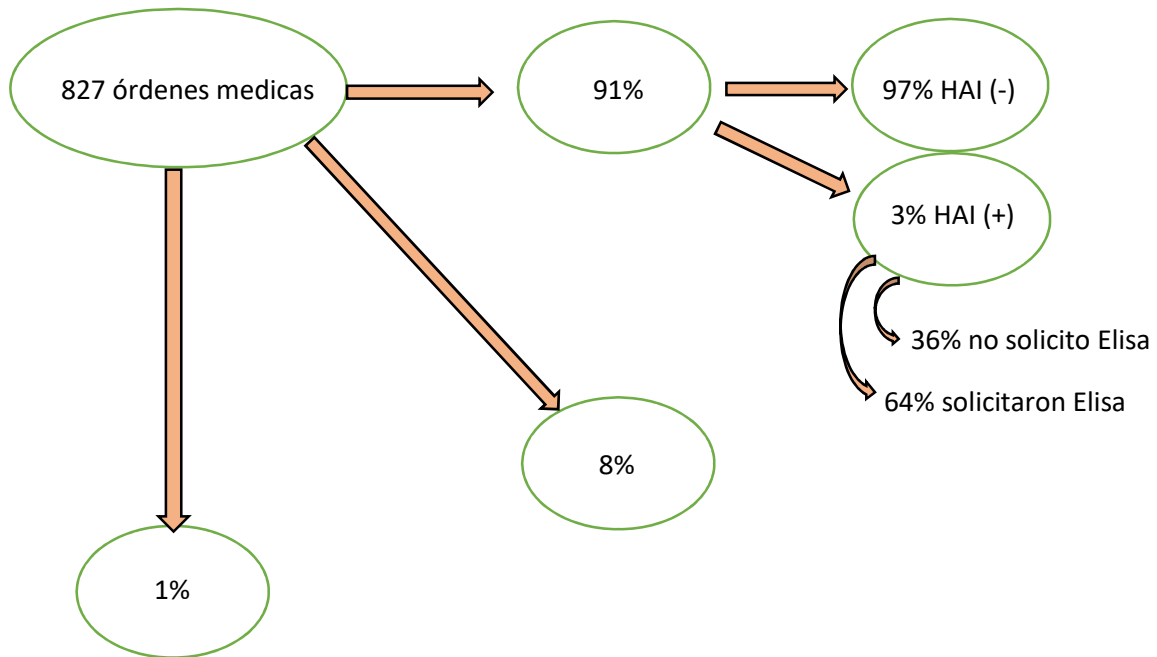
Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo en mujeres embarazadas que fueron asistidas en el Servicio de Urgencias del Hospital Materno Neonatal Eloísa Torrent de Vidal desde octubre de 2018 a octubre de 2020 en el que se revisaron 827 órdenes médicas que solicitaba realización de un método directo para confirmación de Chagas Congénito por el Laboratorio en pacientes desde 2 días de edad hasta 60 días, de ambos sexos que provenía de distintos lugares de la provincia o bien que nacieron en el Hospital. Las mismas contenían Nombre y Apellido de la madre, del niño y los DNI correspondientes, el método directo solicitado (gota gruesa, microstrout un 90% y solo 10% microtubo) y los resultados de las técnicas serológicas efectuadas a las madres en el Nosocomio u otras Instituciones de salud.

Resultados

Del total de ordenes médicas, el 91% (752) solicitaban un estudio parasitológico directo de Chagas congénito al recién nacido con serología no confirmatoria y solo por el método HAI para la mamá. De este grupo, un 97% (729) arrojaron resultados serológicos negativos de la madre y aun así solicitaban un estudio parasitológico del neonato. Por su parte, el 3% (22) restante de las madres que dieron serología positivos, solo el 64% (14) solicitó un segundo análisis por el método de Elisa para confirmar el diagnóstico, los cuales fueron negativos; sin embargo, el 36% restante, no solicitaron un segundo estudio.

Por otra parte, el 8% (67) del total de las órdenes recibidas, solicitaban un diagnóstico por método directo y correspondían a niños de embarazadas que llegaron al establecimiento sin control alguno en los últimos tres meses de gestación, o a aquellos niños que presentaban algún síntoma o factor sospechoso de padecer dicha enfermedad sin tener la madre al menos un estudio serológico.

Finalmente, el 1% (8) del total de las prescripciones solicitaban tal análisis teniendo al menos un estudio serológico de la madre por el método de Elisa, arrojando 5 resultados negativos y 3 positivos, siendo confirmados estos últimos por un método directo. Cabe aclarar que estas órdenes corresponden a embarazadas que fueron controladas durante todo el embarazo o al menos en los últimos tres meses de gestación.



La tasa de curación de la enfermedad de Chagas en el neonato tratado está cercana al 100%, mientras que no tratarla conlleva la cronificación y la posibilidad de desarrollar enfermedad cardíaca o gastrointestinal, además del mantenimiento de portadores reservorios del parásito.

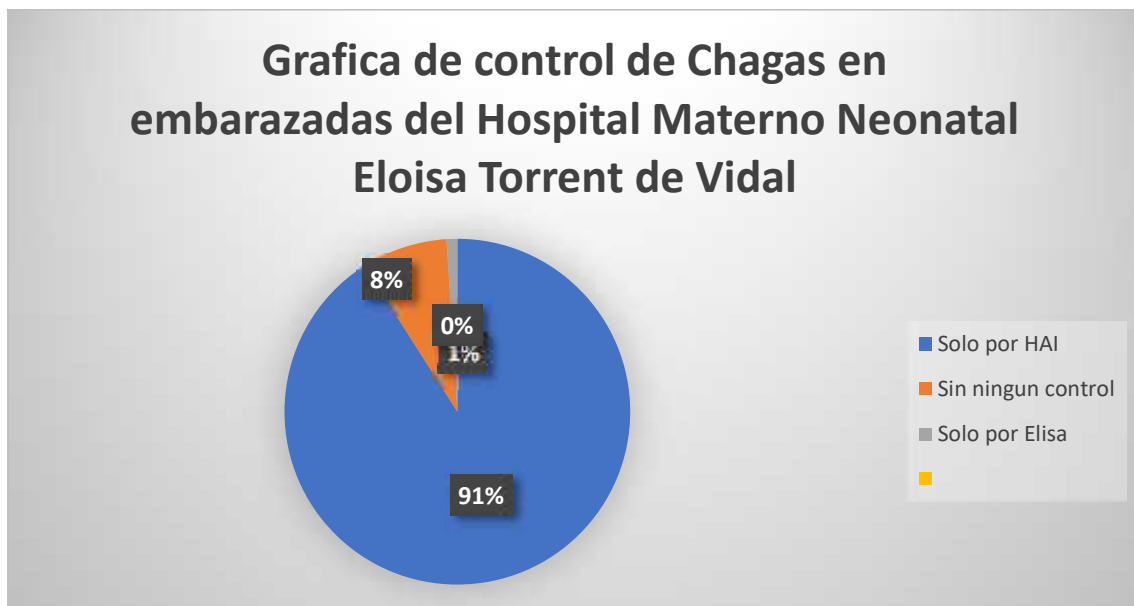
Los test serológicos para madres infectadas son decisivos para el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los recién nacidos infectados y se debe cumplir el algoritmo propuesto para tal fin, confirmándose obligatoriamente por dos técnicas serológicas.

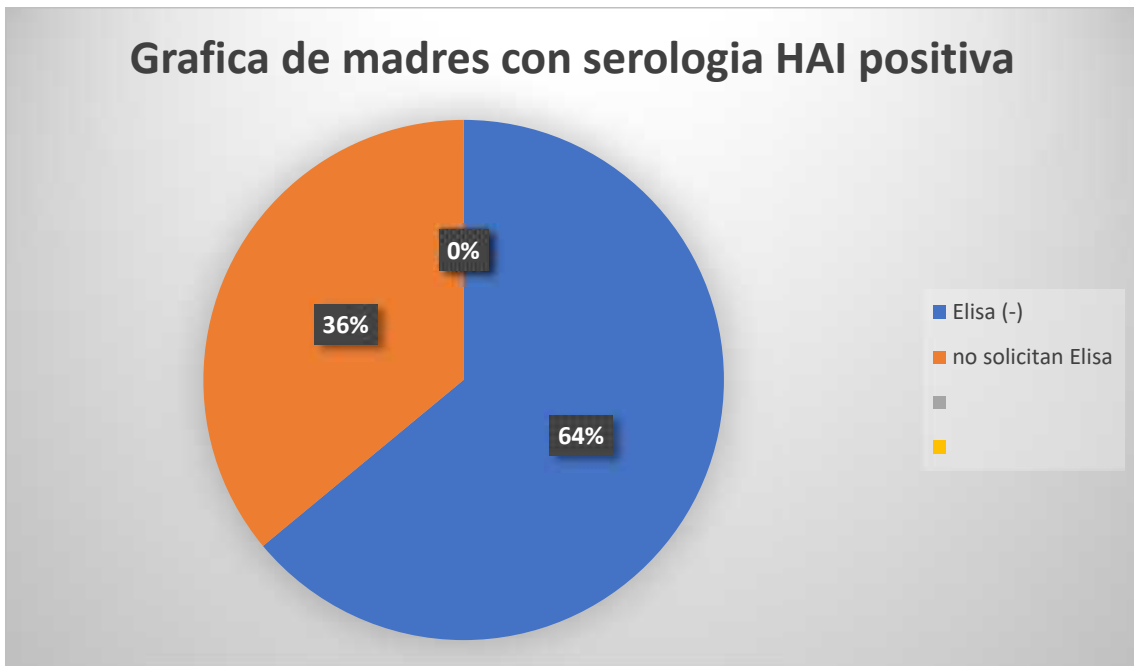
Teniendo en cuenta el algoritmo recomendado para el Diagnóstico:



Figura 2. Algoritmo para el estudio de Chagas congénito en recién nacidos y menores de 1 año.

Se obtuvieron las siguientes gráficas:





Discusión

Se logró alcanzar los objetivos propuestos en el plan de actividades, llevando a cabo un estudio retrospectivo de distintas ordenes médicas que solicitaban realizar un análisis serológico de Chagas congénito en embarazadas y un estudio parasitológico en el recién nacido, entre octubre del 2018 a octubre del 2020.

Se aplicaron técnicas serológicas HAI y ELISA, como screening y de confirmación, sin embargo, para los recién nacidos utilizamos la técnica del microtubo para el diagnóstico parasitológico de Chagas congénito.

Se pudo observar que la mayoría de las prescripciones médicas que solicitaban el diagnóstico parasitológico directo para el neonato, las madres sólo tenían un método serológico realizado, más comúnmente HAI. En cuanto a los recién nacidos de madres positivas, solo unos pocos indicaron que se le realizara un ensayo de confirmación luego del parto por un método directo.

Aun así fueron muy pocas las ordenes que solicitaban un segundo método para confirmar un resultado positivo de dichas embarazadas, incumpliendo con el algoritmo de diagnóstico de Chagas Congénito

Como consecuencia de tal estudio, nos damos cuenta que la prevención de la enfermedad de Chagas congénita representa un nuevo reto para nuestro sistema de salud. No es infrecuente que el embarazo y el parto supongan el único contacto de estas mujeres con el sistema sanitario, brindándonos la oportunidad de realizar el estudio y el diagnóstico, determinar las posibles complicaciones asociadas a la enfermedad e instaurar su tratamiento. El infante infectado puede ser detectado a tiempo y el tratamiento es muy efectivo, los niños se curan en un 100% cuando son detectados a edades inferiores al año.

Por lo tanto, el objetivo fundamental del cribado es la detección de madres infectadas y, de esa forma, determinar aquellos recién nacidos a los que hay que realizarle estudios y tratarlos precozmente, en caso de positividad.

Estos resultados muestran que no se cumple con el algoritmo para el diagnóstico lo cual constituye un serio problema para la salud y que se deben implementar políticas de control y seguimiento tanto para la madre como para el recién nacido alertando a los profesionales de que en forma urgente se debe lograr un cambio en la mentalidad y conciencia puesto que con el diagnóstico adecuado se logra la cura cercana al 100% especialmente en niños.

Es de suma importancia realizar dupla serológica para diagnosticar a la madre y se debe implementar la técnica del microtubo como método directo de referencia para el recién nacido.

La realización de este trabajo por otro lado permitió además adquirir destreza en las distintas técnicas efectuadas, reforzar la práctica e interpretar los resultados, mejorar el trabajo en equipo y adquirir espíritu crítico, constituyendo así una mejora a la formación profesional.

Bibliografía

-) REVISTA ARGENTINA DE CARDIOLOGÍA (2011). Consenso de Enfermedad de Chagas-Mazza.
-) MANUAL DE NORMAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE CHAGAS CONGÉNITO (2011). 52-72
-) Atias- Neghme, Parasitología Clínica, Tercera edición. 1991
-) García, F. et al. “Guía de prevención y tratamiento de infecciones congénitas y perinatales”, Edición 1°. Editorial: Ministerio de Salud de la Nación. 2010.
-) Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Normas para el diagnóstico de la infección Chagasica. Guía para la atención al paciente infectado con Tripanosoma cruzi, Programa Federal de Chagas. 2008.
-) Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Guía para el control vectorial de la enfermedad de Chagas. Programa Nacional de Chagas. 2012.
-) Ministerio de Salud, Presidencia de la Nación. Guía de nociones generales para abordar la problemática de Chagas con la comunidad. Programa Nacional de Chagas. 2011. Segunda edición.
-) Chiarpenello J. Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). Evid.actual.pract.ambul 2004;7:114-119
-) M.I. González-Tomé, P. Rojo y M. Flores-Chávez. Vacunas y otras medidas preventivas Enfermedad de Chagas. Prevención de la infección en el recién nacido. 2008
-) Enfermedad de Chagas, transmisión maternofetal y experiencia recogida en nuestro centro. Institut Clínic de Ginecología, Obstetricia i Neonatología. Hospital Clinic. Universidad de Barcelona.2006
-) Cristina Riera. EDUCACIÓN CONTINUADA EN EL LABORATORIO CLÍNICO.2012-2013. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS. Universidad de Barcelona.
-) Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá 1999.Chagas congénito. Presentación de una caso clínico y revisión bibliográfica.