



TESIS DE MAESTRIA
MEDICINA TROPICAL E HIGIENE.

TITULO
“Estandarización de la Reacción de PCR en Tiempo Real para el diagnóstico de Chagas Congénito”

Tesista: Bioq. Natalia Andrea Ayala

Director de Tesis: Dr. Raúl Horacio Lucero

Lugar de realización: Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco

Año de presentación: 2017

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por haberme proporcionado la mejor educación, lecciones de vida y confiar en mis decisiones.

A mi director de tesis ya que sin su ayuda, dedicación, conocimiento y paciencia no hubiese sido posible este proyecto.

A mis hijas Margarita y Violeta que son lo mejor y más valioso que Dios me ha dado.

A Miguel que siempre estuvo a mi lado apoyándome incondicionalmente y ayudando hasta donde era posible e incluso más.

A mis compañeros de trabajo y amigos quienes sin esperar nada a cambio compartieron sus conocimientos, alegrías y tristezas.

Muchas Gracias!!!!

RESUMEN

En este trabajo se estandarizó una PCR en tiempo real para detectar ADN satelital de *T. cruzi*, con el objeto de que sea aplicada a la detección de Chagas Congénito en un laboratorio de Salud Pública de la Provincia del Chaco.

Dicho trabajo de estandarización comprendió desde el diseño del laboratorio de Biología Molecular, hasta la obtención de los resultados finales. En el proceso también se prepararon diluciones artificiales de epimastigotes de cultivo (clon CL-Brener), con el objeto de construir la curva estándar que nos permita validar la linealidad del ensayo de qPCR.

También se implementó un sistema de control externo de calidad para PCR en tiempo real desarrollado en el laboratorio de Biología Molecular del INP-Fatala Chaben. Se recibieron paneles de control para realizar los métodos de PCR implementados en el laboratorio con el objeto de controlar todos los procesos transferidos.

Por último se procesaron muestras clínicas de individuos con Chagas crónico, proporcionadas por el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Medicina Regional de la UNNE de manera de cuantificar la carga parasitaria de las mismas en sangre periférica y compararlas con los valores obtenidos anteriormente en este último laboratorio, como un proceso más de control interlaboratorial.

OBJETIVO GENERAL:

Estandarizar un protocolo basado en la técnicas de PCR en tiempo real para el diagnóstico de la infección congénita por T. cruzi en el LCSPCh.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Establecer la metodologías de PCR de referencia para el diagnóstico de la infección por T. cruzi, transferidas por el departamento de diagnóstico del INP, priorizando su aplicación en el diagnóstico de la infección congénita temprana, también aplicable al monitoreo post-terapéutico y de reactivación de la enfermedad en pacientes inmunosuprimidos.
- Realizar un ensayo de implementación que incluya la validación de las técnicas de PCR con muestras de campo y un ensayo piloto de transferencia.
- Incorporar un Control de Calidad Externo que garantice la confiabilidad de los resultados y que sea monitoreado por el INP.

INDICE DE CONTENIDOS

Introducción.....	Pág.07
1.Agente etiológico: Trypanosoma cruzi.....	Pág.11
2 Infección por T. cruzi y enfermedad de Chagas.....	Pág.13
2.1 Etapas de la infección.....	Pág.13
2.2 Chagas congénito.....	Pág.15
2.3 La enfermedad en pacientes inmunosuprimidos.....	Pág.17
2.4 Evaluación del paciente y tratamiento etiológico.....	Pág.19
3 Diagnóstico de la infección.....	Pág.21
3.1 Diagnóstico parasitológico.....	Pág.21
3.1.1 Técnicas directas.....	Pág.21
3.1.2 Técnicas indirectas.....	Pág.22
3.2 Diagnóstico serológico.....	Pág.22
4 Detección y tipificación de T. cruzi mediante métodos de amplificación génica.....	Pág.23
4.1 Reacción en cadena de la polimerasa.....	Pág.23
4.2 PCR para la detección de T. cruzi.....	Pág.26
Materiales y Métodos.....	Pág.28
Resultados.....	Pág.33
Discusión.....	Pág.37
Conclusiones.....	Pág.41
Anexos.....	Pág.43
Bibliografía.....	Pág.49

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS:

ADN: ácido desoxirribonucleico.

kADN: ADN de Cinetoplasto.

satADN: ADN satélite.

T. cruzi: Trypanosoma cruzi.

POE: Procedimiento Operativo Estandarizado.

INP: Instituto Nacional de Parasitología Fátala-Chabén.

INGEBI: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular “Dr. Héctor N. Torres”. CONICET.

IMR: Instituto de Medicina Regional.

UNNE: Universidad Nacional del Nordeste.

LCSPCh: Laboratorio Central de Salud Pública de la provincia del Chaco.

SNVS: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud.

SIVILA: Sistema Nacional de Vigilancia Laboratorial.

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

LAMP: Loop Mediated Isothermal Amplification.

INTRODUCCIÓN

Carlos Chagas 1879-1934



"Hay un designio nefasto en el estudio de la tripanosomiasis. Cada trabajo, cada estudio, apunta un dedo hacia la población mal nutrida que vive en malas condiciones; apunta hacia el problema económico y social que a los gobernantes les produce tremenda desazón pues es testimonio de su incapacidad para resolver un problema inconmensurable. ..Hable de esta enfermedad y tendrá a los gobiernos en contra."

Introducción

El 23 de abril de 1909 el científico brasileño Carlos Chagas detectó, por primera vez en la sangre de una niña de tres años, el parásito causante de la enfermedad que hoy lleva su nombre, logrando un hecho inédito en la medicina al descubrir una nueva enfermedad (tripanosomiasis americana, más tarde llamada enfermedad de Chagas-Mazza), al identificar su agente causal (*Trypanosoma cruzi*), al describir su vector (*Triatoma infestans - vinchuca*) y al detallar su epidemiología, sintomatología y profilaxis, especificando los huéspedes.

Posteriormente, el sanitarista argentino Salvador Mazza redescubrió la enfermedad, haciéndola conocer al mundo científico. En 1926 encontró el parásito (*Trypanosoma cruzi*) en un perro infectado naturalmente, y en 1927 diagnosticó clínicamente el primer caso agudo en la Argentina. En 1935 Cecilio Romaña describió el síndrome de puerta de entrada ocular, con compromiso ganglionar, al que llamó complejo oftalmo-ganglionar, cuya expresión clínica es el chagoma ocular, posteriormente denominado “signo de Romaña”.

La importancia de la enfermedad radica en su elevada prevalencia, su incurabilidad en la forma crónica, las grandes pérdidas económicas por incapacidad laboral, y la muerte repentina de personas aparentemente sanas. Se contempla dentro de la lista de las principales “enfermedades desatendidas”.

La infección se transmite principalmente por triatóminos de la familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera* (chinchas), Subfamilia *Triatominae*.

Otros modos de transmisión son: transfusional, congénito, trasplante de órganos y oral.

Se estima unos 7 millones de personas están infectadas a nivel global, con 21 países endémicos de la enfermedad en Latinoamérica, en los que la principal mecanismo de transmisión es a través del contacto con heces de los triatóminos, los artrópodos vectores, infectados (WHO. Chagas disease - American trypanosomiasis. Fact sheet. March 2017), con riesgo de infección un mínimo de 110 millones de personas en 21 países (Argentina, Belice, Bolivia, Brasil, Chile, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Guyana Francesa, Honduras, México, Nicaragua, Uruguay, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam, Venezuela Salazar-Schettino et al., 2016).

El escenario nacional actual de la enfermedad de Chagas presenta una “situación de alto riesgo para la transmisión vectorial” en las provincias de Chaco, Formosa, Santiago del Estero, San Juan, Mendoza y Córdoba”. Así lo confirma el Boletín Integrado de Vigilancia que elabora la Secretaría de Promoción y Programas Sanitarios del Ministerio de Salud de la Nación. El reporte de septiembre de 2012, advierte que esos distritos provinciales “presentan una reemergencia de la transmisión vectorial de Chagas debido a un aumento de la infestación domiciliar y a una alta seroprevalencia en grupos vulnerables”.

El informe destaca que “la transmisión congénita en base a los datos disponibles en el sistema no sigue el patrón de riesgo de transmisión vectorial. En tanto, de las primeras provincias

en orden de frecuencia de casos confirmados de Chagas Agudo Congénito sólo dos son de alto riesgo de transmisión vectorial”. Sumado a esto, y a pesar del subregistro evidente que aún persiste, en los últimos años se confirmaron 237 casos de transmisión congénita hasta la fecha, mientras que sólo fueron registrados 170 casos de transmisión vectorial en casi 10 años, lo que acentúa la importancia de intensificar la vigilancia y control de la transmisión de la madre al niño como la principal vía de transmisión en Argentina en el momento actual.

Chagas congénito

Solo el 10-30% de los recién nacidos infectados presenta sintomatología (Torrice y col., 2004). Generalmente la detección de la infección se realiza en la adultez, en el transcurso de la fase indeterminada, o más adelante, al aparecer las manifestaciones de la enfermedad (Freilij y Altcheh, 1995; Burgos y col., 2005). Se han descripto abortos espontáneos, nacimientos prematuros, retardo de crecimiento intrauterino, mortinatos y diversas formas clínicas que pueden ir desde bajo peso al nacer, hepatomegalia, esplenomegalia, síntomas respiratorios agudos, anemia, hasta manifestaciones digestivas, cardíacas y compromiso del sistema nervioso central (SNC). Estas y otras manifestaciones, con frecuencias diferentes según el área geográfica, han sido ampliamente descriptas (Freilij y Altcheh, 1995, Bern y col, 2011).

Para confirmar o descartar la transmisión congénita es necesario realizar el control a todos los hijos de madre reactiva, durante el primer año de vida. Este seguimiento implica la articulación entre los distintos componentes de la estructura de salud (neonatología, laboratorio, atención primaria de la salud, programa provincial de chagas) que deben cumplimentar las actividades del mismo.

Desde la Red Bioquímica (y con la incorporación del Sistema Nacional de Vigilancia Laboratorial-SIVILA-) el control de chagas congénito se incluye en la “estrategia de pesquisa neonatal”, y se realiza la búsqueda desde la mujer embarazada al niño.

A continuación se detallan los casos notificados por este sistema en lo que va del corriente año:

Casos informados durante el año 2017 al SIVILA en la provincia del Chaco.

Sivila Notificacion Individual - Listado Condensado

total Provincial fichas cargadas al 31/10/17	
Chagas Agudo Congenito	156
Caso confirmado de infección por <i>T.cruzi</i>	15
Infección congénita confirmada por serología	2
En estudio	138
Caso DESCARTADO	1

Provincia: CHACO
Depto/Partido: Todos
Localidad: Todas
Desde Fecha toma muestra: 01/01/2017
Hasta Fecha toma muestra: 31/12/2017
Grupo: CHAGAS
Evento: *CHAGAS AGUDO CONGENITO

Modalidad de vigilancia: FICHA INDIVIDUAL EXCLUSIVAMENTE para todo niño/a hijo/a de madre positiva < de 18 meses (caso notificado).

Si el resultado parasitológico es positivo, consignar como Resultado de laboratorio: Caso confirmado de infección por *Trypanosoma cruzi*.

En estudios serológicos realizados en niños de entre 10 y 18 meses de vida, en hijos de madre positiva para Chagas, se toman los siguientes criterios

- ante serología reactiva por dos técnicas serológicas con títulos superiores al de corte, en una misma muestra de suero, consignar como resultado de laboratorio Infección congénita confirmada por serología.
- ante serología no reactiva por dos técnicas serológicas en una misma muestra de sangre, consignar como resultado de laboratorio Caso descartado.

A continuación se detallan los casos reportados por el sistema por zonas del país entre los años 2015 a 2016 (50 semana epidemiológica):

Chagas agudo congénito
Casos Acumulados hasta la 50ª semana epidemiológica
PAIS ARGENTINA por Provincia. Años 2015 - 2016

PROVINCIA	2015		2016		Variación porcentual / Dif. absoluta 2015-2014 NOTIF.	Variación porcentual / Dif. absoluta 2015-2014
	Notif.	Confir.	Notif.	Confir.		
CABA	187	7	154	1	-17,6	-6
Buenos Aires	309	41	220	21	-28,8%	-48,7%
Córdoba	33	8	66	1	100%	-7
Entre Ríos	5	1	1	0	-4	-1
Santa Fe	317	4	252	9	-20,5%	5
Centro	851	61	693	32	-18,5%	-47,5%
Mendoza	374	4	303	11	-18,9%	7
San Juan	107	2	108	5	0,934%	3
San Luis	49	6	36	0	-26,5%	-6
Cuyo	530	12	447	16	-15,6%	4
Corrientes	15	0	1	1	-14	1
Chaco	213	14	280	8	31,45%	-6
Formosa	66	13	36	7	-45,4%	-6
Misiones	48	5	55	1	14,58%	-4
NEA	342	32	372	17	8,771%	-15
Catamarca	1	0	1	0	0	0
Jujuy	22	0	5	3	-17	3
La Rioja	13	0	3	1	-10	1
Salta	268	17	216	14	-19,4%	-3
Santiago del Estero	29	1	180	6	520,6%	5
Tucumán	163	9	119	2	-26,9%	-7
NOA	496	27	524	26	5,645%	-3,70%
Chubut	30	2	21	1	-30%	-1
La Pampa	4	1	3	1	-1	0
Neuquén	39	1	22	1	-43,5%	0
Río Negro	28	2	16	2	-12	0
Santa Cruz	23	3	13	0	-10	-3
Tierra del Fuego	11	0	0	0	-11	0
Sur	135	9	75	5	-44,4%	-4
Total PAIS ARGENTINA	2354	141	2111	96	-10,3%	-31,9%

Fuente: Sistema Nacional de Vigilancia de la Salud - SNVS -C2/SIVII.A

1 El **agente etiológico** de la enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi*. Su clasificación filogenética es la siguiente:

Reino: *Protista*

Phylum: *Sarcomastigophora*

Sub-phylum: *Mastigophora*

Clase: *Zoomastigophorea*

Orden: *Kinetoplastida*

Sub-orden: *Trypanosomatina*

Familia: *Trypanosomatidae*

Género: *Trypanosoma*

Sub-genero: *Schizotrypanum*

Especie: *cruzi*

Trypanosoma cruzi pertenece al orden de los kinetoplastidos, un grupo ampliamente distribuido de protozoos que poseen uno o dos flagelos. Conforman un grupo monofilético que divergió tempranamente de la rama común a los organismos eucariotas. La característica morfológica que los distingue es una estructura prominente y paraflagelar conocida como cinetoplasto, que corresponde a una condensación de ADN (ADNk), localizado en el interior de una única mitocondria que esta ramificada por toda la célula. Dentro de la familia *Trypanosomatidae*, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes por incluir una serie de especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, *T. brucei gambiense* y *T. brucei rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad de Chagas y del sueño, respectivamente; y *T. brucei brucei*, *T. equiperdum*, *T. evansi* y *T. equinum*, causantes de enfermedades en animales. En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género *Trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El primero de ellos, llamado Stercoraria, incluye a los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, con liberación de las formas infectivas en las heces. A este grupo pertenecen *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye a tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo, atraviesan el epitelio digestivo, y llegan a las glándulas salivales, donde las formas infectivas son inoculadas mecánicamente. En este grupo se encuentran *T. brucei*, *T. congolense* y *T. rangeli*.

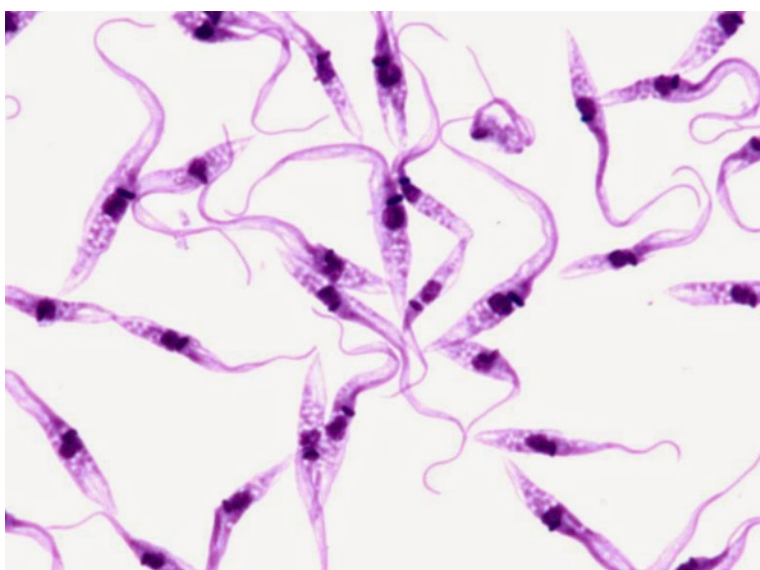


Figura N° 1 Tripomastigotes.
Ministerio de Protección Social.
Guía Protocolo para la vigilancia
en salud pública de Chagas. 2010.
Colombia

Ciclo vital:

Trypanosoma cruzi es un parásito unicelular que alterna su vida entre dos hospedadores multicelulares, uno invertebrado y otro vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético (Figura I1). En función de la morfología celular (esférica, piriforme o alargada), la posición relativa entre el núcleo y el cinetoplasto (anterior, lateral o posterior), la forma de salida del flagelo (central o lateral), se definen tres formas evolutivas (Figura I1):

Epimastigote: forma elongada (20 - 40 x 2 µm), con el origen del flagelo próximo y por delante del núcleo. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos, y constituye una de las formas proliferativas del parásito. Es la forma que más fácilmente se cultiva “in vitro”.

Tripomastigote: forma elongada (20 - 25 µm), con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo. El flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior, y crea la imagen de una membrana ondulante. Es la forma infectiva y no tiene capacidad replicativa. Este estadio se encuentra en la circulación del mamífero (tripomastigote circulante) y en la ampolla rectal del vector (tripomastigote metacíclico).

Amastigote: forma esférica u ovalada (2 - 4 µm), que carece de flagelo libre. Es el estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.

• **Etapas en el ser humano.** El ciclo se inicia cuando un insecto hematófago infectado pica a un ser humano y defeca. Los *tripomastigotes metacíclicos* se transmiten en las heces (1 en la figura). Entran en el huésped a través de la herida o por el cruce de las membranas mucosas. Cuando entran en una célula humana, se convierten en amastigotes (2). Esta es una etapa reproductiva a través de la mitosis. Después de la reproducción, una gran cantidad de amastigotes se encuentran en la célula infectada, formándose pseudoquistes (3). El amastigote se convierte de nuevo en tripomastigote y la célula se rompe. El *tripomastigote* vuelve a infectar otra célula repitiéndose el ciclo de multiplicación (4).

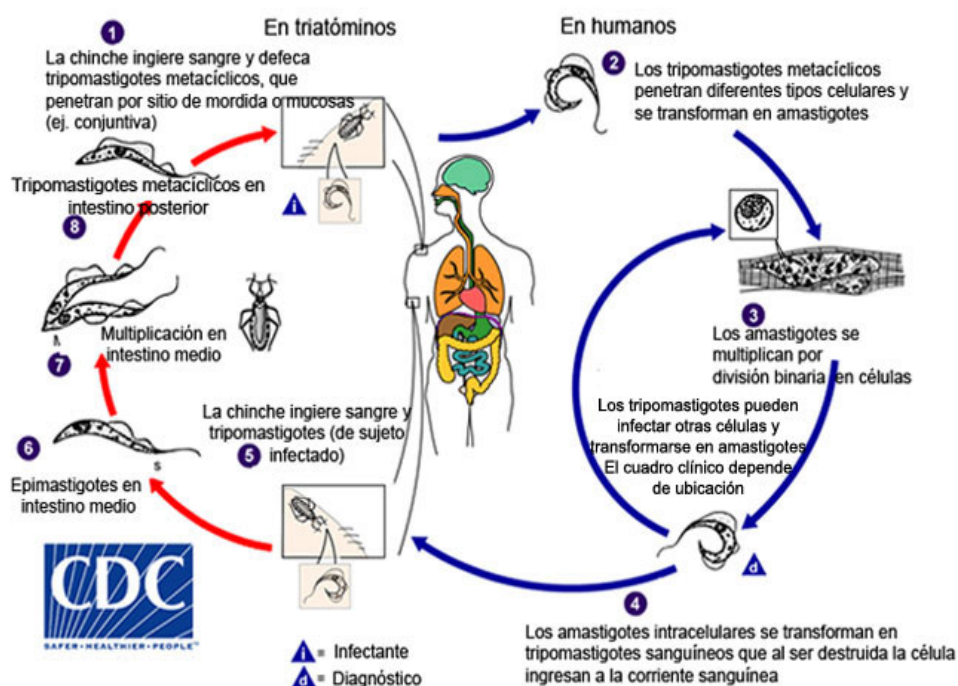


Figura N° 2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. <http://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisAmerican/index.html>

• **Etapas en el insecto.** Cuando el insecto pica a un huésped infectado, algunos *tripomastigotes* pasan a él a través de la sangre (5). En el intestino del insecto, se transforman en *epimastigotes* (6), los cuales constituyen una segunda etapa reproductiva (7). Después de la reproducción a través de mitosis, los epimastigotes pasan al recto. Allí se convierten en *tripomastigotes metacíclicos* (8) y se evacúan a través de las heces. Las heces pueden infectar a un nuevo huésped (1), repitiéndose el ciclo.

2 INFECCIÓN POR *T. cruzi*

2.1 Etapas de la Infección:

La infección por *T. cruzi* evoluciona en dos fases: aguda y crónica. Cada una de ellas presenta características clínicas y criterios diagnósticos y terapéuticos diferentes.

La fase aguda de la infección por *T. cruzi* se caracteriza por la presencia de parásitos en sangre en concentración elevada, la cual puede ser detectada por métodos parasitológicos directos como los métodos de concentración. Se extiende durante dos a cuatro meses. Es de curso habitualmente benigno en pacientes inmunocompetentes, con una tasa de letalidad del 2 al 7%. Un bajo porcentaje de los casos de enfermedad de Chagas se detectan en esta etapa. Como regla general, la fase aguda se inicia en el momento de adquirir la infección por cualquiera de sus vías. En algunos casos, se observan signos de puerta de entrada o chagomas de inoculación, lesiones cutáneas que son más frecuentes en cara y extremidades. Los chagomas pueden presentarse en cualquier parte de la piel, con aspecto furunculoideo, de color rosado o violáceo, e indurados. Un signo típico es el que se observa en la región ocular, llamado signo de Romana- Mazza. En general, las manifestaciones clínicas de la etapa aguda son más frecuentemente observadas en niños, donde el desarrollo de miocarditis aguda llega a ser mortal en un 5% de los casos. Algunos pacientes presentan compromiso meningo-encefálico. En esta fase, las formas tripomastigotes son fácilmente detectadas en sangre debido a la elevada parasitemia.

Otras formas de presentación, como la reactivación de una infección crónica en un paciente inmunodeficiente, tienen algunas similitudes a la fase aguda de la primoinfección (reagudización). La duración y la presentación clínica de la fase aguda pueden ser variables, dependiendo de la edad del paciente, del estado inmunológico, la presencia de comorbilidades y la vía de transmisión.

En cuanto a la presentación clínica, la misma puede ser sintomática, oligosintomática o asintomática, siendo esta última la forma clínica más frecuente. Por tal motivo es indispensable mantener una actitud alerta y considerar la Enfermedad de Chagas en todo individuo con antecedentes epidemiológicos (permanencia en área rural endémica, haber recibido transfusiones o nacido de una madre infectada).

En todo individuo con sospecha clínica (síndrome febril prolongado, astenia, hepatoesplenomegalia, etc.) de infección aguda por *T. cruzi* se debe:

- Realizar el diagnóstico de la infección aguda por métodos de laboratorio.
- Evaluar el estado clínico y potenciales complicaciones
- Evaluar la situación epidemiológica y posibles vías de transmisión.

La aparición de un caso de infección aguda por *T. cruzi*, independientemente de la vía de transmisión, es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo que el médico interviniente debe:

- Confirmar el caso, definir la vía de transmisión, y tomar la conducta terapéutica indicada.
- Hacer de inmediato la notificación a la Dirección de Epidemiología Provincial y al Programa Provincial de Chagas.

Fase crónica: Corresponde a la etapa que sigue a la fase aguda y comienza cuando la parasitemia se vuelve indetectable por los métodos parasitológicos directos por concentración. En esta fase, la infección es detectable principalmente por métodos serológicos (que demuestran la respuesta inmunológica del huésped frente al parásito) y también por métodos moleculares. Debido a que la mayoría de las infecciones agudas por *T. cruzi* ocurren en forma asintomática, una gran proporción de las personas infectadas son diagnosticadas en la fase crónica, por lo tanto debe sospecharse en cualquier individuo que:

- Resida o haya residido en zonas endémicas en forma habitual o esporádica, tenga o no antecedentes clínicos compatibles con enfermedad de Chagas aguda o contacto con el vector.
- Su madre biológica esté infectada por *T. cruzi*.
- Haya recibido transfusión de sangre y/ hemoderivados.
- Haya sido o sea usuario de drogas inyectables.
- Refiera tener o haber tenido síntomas o signos compatible con infección por *T. cruzi*.
- Tuviera familiar cercano que presentara enfermedad cardíaca o muerte súbita a edades tempranas y/o con antecedentes de serología reactiva para *T. cruzi*.

La mayor parte de las personas con infección crónica cursan el resto de su vida en forma asintomática. Aproximadamente el 30% de estas personas desarrollarán lesión de órganos (principalmente a nivel cardíaco y/o digestivo), en un plazo de 10 a 20 años, con signos y síntomas de expresión variada. De acuerdo a ello, esta fase se clasifica en dos formas clínicas: con patología demostrada y sin patología demostrada (anteriormente llamada forma indeterminada).

El Comité Científico de Enfermedad de Chagas de La Federación Argentina de Cardiología y el Consejo de Miocardiopatías y Enfermedad de Chagas de la Sociedad Interamericana de Cardiología reunidos en Buenos Aires durante el 7mo. Congreso Virtual de Cardiología en el año 2010 propuso una nueva clasificación para la Enfermedad de Chagas. Según este Consenso Internacional Buenos Aires 2010, donde participaron expertos de Ecuador, Perú, Chile, Paraguay, Guatemala, Panamá, El Salvador, Uruguay, Venezuela, Costa Rica, Bolivia, Honduras, Brasil, México, Puerto Rico, Estados Unidos y Argentina, se recomienda sustituir la antigua clasificación:

Chagas Agudo

Chagas Crónico:

- 1) Crónico Indeterminado
- 2) Crónico Sintomático

por la nueva clasificación:

Chagas Agudo:

- a) Sintomático
- b) Asintomático

Chagas Crónico:

- 1) Sin Patología Demostrada
- 2) Con Patología Demostrada.

Esta clasificación está basada, entre otros argumentos, en que para el común de la gente ser sano significa no tener enfermedad, mientras que para los médicos es no tener evidencia de evolución clínica. Pero no encontrar evidencia no significa que no exista.

A continuación se muestra el Algoritmo sugerido para la evaluación del paciente con infección crónica:

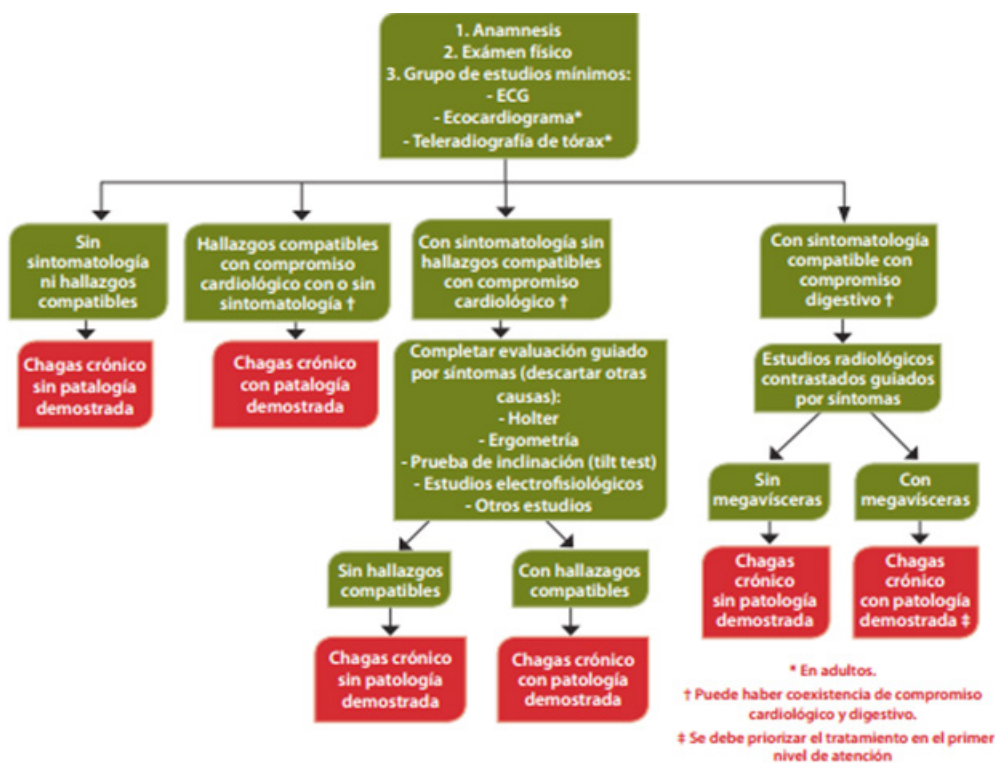


Figura Nº 3 Algoritmo para la evaluación inicial de la persona con infección crónica por *T. cruzi*. Guías para la atención al paciente con Enfermedad de Chagas.

2.2 Chagas congénito

Se estima que la vía congénita de infección es la vía más frecuente en la generación de nuevos casos. El Chagas congénito es la forma aguda de infección más frecuente en Argentina.

Debido a que la infección con *T. cruzi* de la madre es un elemento indispensable en la génesis de un caso congénito, las medidas de control clínico deben comenzar antes del nacimiento del bebé, mediante la evaluación de toda mujer embarazada.

Control de la embarazada: de acuerdo a la ley nacional Nro. 26.281/07, toda mujer embarazada debe ser estudiada para confirmar o descartar una infección crónica por *T. cruzi* a través de una muestra de sangre. Idealmente, dicho estudio debería solicitarse en su primer control prenatal. Para ello deben realizarse dos pruebas serológicas en paralelo. Toda mujer embarazada que llegue al parto sin este estudio, debe realizarse el mismo durante su internación en el Centro Asistencial. Se recomienda verificar el resultado antes del alta. Recordar que la infección crónica no constituye una urgencia y que el embarazo contraindica la realización de estudios radiológicos y no se recomienda el tratamiento tripanocida en este período. El diagnóstico de infección crónica por *T. cruzi* en toda mujer en edad fértil obliga al estudio y evaluación de toda su descendencia. Los hijos mayores de 10 meses deberán ser estudiados por dos pruebas serológicas en paralelo. La infección por *T. cruzi* de la madre no constituye una contraindicación para la lactancia.

Control del recién nacido: de acuerdo a la ley nacional de pesquisa neonatal Nro 26.279

del año 2007, todos los recién nacidos vivos deben ser estudiados luego del nacimiento para descartar una eventual infección congénita por *T. cruzi*. Además, la ley Nro 26.281/07 hace obligatorio el seguimiento y estudio de todo niño de madre con infección crónica por *T. cruzi* hasta el año de vida. La confirmación diagnóstica de la infección congénita puede realizarse mediante la identificación directa del parásito en sangre (en las primeras semanas de vida) o por demostración de la serología reactiva una vez que desarrolle su sistema inmunológico (a partir de los 10 meses de edad). Debido a que la parasitemia inicial en la infección congénita puede ser baja y no detectable por los métodos convencionales de concentración, la exclusión de la infección congénita sólo puede realizarse luego de un seguimiento adecuado del recién nacido que permita demostrar que no desarrolló anticuerpos anti-*T. cruzi* a partir de los 10 meses de vida. En cuanto a las manifestaciones clínicas, la mayoría de los niños con infección congénita, aproximadamente 90%, son asintomáticos. Los casos con manifestaciones clínicas pueden presentar:

- Hepatomegalia
- Esplenomegalia
- Ictericia
- Prematurez
- Bajo peso
- Anemia
- Taquicardia persistente

Menos frecuentemente puede observarse: Hepatitis neonatal, Sepsis, Miocarditis, Meningoencefalitis, Edemas, Fiebre Exantemas. Con menos frecuencia puede presentarse: *Megaeosófago * Megavejiga * Neumonitis * Calcificaciones cerebrales.

Los signos o manifestaciones de la infección congénita pueden ser de aparición precoz, en el período neonatal inmediato, o tardío después de los 30 días.

Diagnóstico y seguimiento de la infección congénita: Todo recién nacido de madre con infección crónica por *T. cruzi* debe ser estudiado y seguido para confirmar o descartar una infección trasplacentaria. El tratamiento tripanocida está indicado una vez que se confirme la infección. Para la evaluación de todo recién nacido se recomienda el siguiente esquema, el cual se resume en la Figura 4: Primer control del recién nacido: Implementar la búsqueda directa de *T. cruzi* por medio de un Micrométodo parasitológico en el periodo perinatal, preferentemente antes del alta del Centro Asistencial o lo más cercano al nacimiento. En todo niño cuyo control comience después del alta, el estudio de la infección congénita puede iniciarse con un método parasitológico directo hasta el noveno mes de vida. Sin embargo, la sensibilidad de estos métodos disminuye después del tercer mes. Si el resultado parasitológico es positivo, se deberá realizar el tratamiento etiológico. En caso de ser negativo, el niño deberá ser evaluado nuevamente entre los 10 a 12 meses con métodos de detección de anticuerpos específicos.

Control del niño a partir de los 10 meses de edad: Llegados a este momento del seguimiento de un posible caso de infección congénita, la parasitemia será negativa. Por tal motivo, será necesario estudiar la respuesta inmunológica del niño mediante la realización de un análisis de sangre con dos técnicas serológicas en paralelo. No se recomienda la realización de estudios serológicos antes de los 8 meses de vida dado que un resultado reactivo antes de esta edad puede ser el resultado de una transferencia de anticuerpos maternos, y no por infección congénita. Una vez que se descarte la infección congénita por métodos serológicos (a partir de los 10 meses) el niño podrá ser dado de alta del seguimiento. En el caso que los estudios

confirman la ocurrencia de la infección congénita, el niño deberá ser tratado. A todo niño que reciba tratamiento tripanocida en área endémica, independientemente de que la infección haya sido adquirida por vía congénita, el Programa Provincial de Control de Vectores deberá intervenir para que la vivienda y el peridomicilio estén libres de triatominos.

Se muestra a continuación el Algoritmo sugerido para el estudio de la infección congénita:



Figura Nº 4 Algoritmo para el estudio de Chagas congénito en recién nacidos y menores de 1 año. Guías para la atención al paciente con Enfermedad de Chagas

2.3 Pacientes inmunosuprimidos: Existen dos posibilidades que pueden suceder en un paciente inmunocomprometido: i) que una infección crónica se reactive, o ii) que adquiera una infección aguda por diferentes vías de transmisión. En ambas circunstancias, el cuadro clínico es muy grave y requiere un rápido diagnóstico para que el tratamiento etiológico sea efectivo, para evitar complicaciones asociadas. En las formas agudas o reagudizadas en pacientes inmunodeficientes las manifestaciones más frecuentes son el síndrome febril prolongado y las neurológicas (meningoencefalitis y/o granuloma cerebral). En orden de frecuencia le siguen las manifestaciones cardiológicas (miocarditis, arritmias, insuficiencia cardíaca). También puede observarse en pacientes trasplantados cardíacos lesiones como la paniculitis aguda en brazos, piernas y abdomen.

Personas con infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH): Se estima que el riesgo de reactivación en una persona con infección crónica por *T. cruzi* se inicia cuando tiene recuentos de CD4 inferiores a 200 células/mm³, al igual que para otras enfermedades oportunistas.

Las manifestaciones más frecuentes de la reactivación en estos pacientes son miocarditis, meningoencefalitis, pseudotumores cerebrales, miocarditis y síndrome febril prolongado. La mortalidad es muy elevada si no se realiza un diagnóstico precoz que permita instaurar rápidamente el tratamiento etiológico. Desde el punto de vista clínico, toda persona con infección por VIH debe ser estudiada con el fin de descartar una infección crónica por *T. cruzi*. Todo paciente con infección crónica por *T. cruzi* en el cual se haga diagnóstico de infección por VIH debe iniciar tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) de acuerdo a los criterios

de guías nacionales o internacionales. El tratamiento indicado para las reactivaciones por Enfermedad de Chagas en pacientes inmunodeprimidos por infección por VIH es el convencional. Sin embargo, la duración del tratamiento no ha sido definida, pudiendo ser necesario prolongar el tratamiento más allá de los 60 días en casos que no haya cambios favorables en la clínica o en las imágenes. Simultáneamente, el paciente debe recibir el TARGA con el objetivo de recuperar un valor de CD4 superior a 200 células/mm³. Una vez concluido el tratamiento de la fase aguda, y de persistir el paciente con un recuento de CD4 inferior a 200 células/mm³ puede indicarse profilaxis secundaria. Para la profilaxis secundaria se emplean las mismas drogas y dosis diarias.

Debe considerarse que la indicación de profilaxis secundaria es empírica (derivada del manejo de otras infecciones oportunistas) dado que no hay estudios al respecto.

Trasplante de órganos y de células hematopoyéticas: Todo donante y receptor de órganos deben tener el estudio serológico para esta parasitosis. Dicha evaluación debe realizarse con dos reacciones simultáneas. Cualquiera sea la indicación de intervención terapéutica por la patología de base sobre el paciente, es necesario que se siga un protocolo estandarizado de diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la potencial reactivación en un paciente con infección crónica que será inmunodeprimido, así como de la infección aguda transmitida por el órgano donado o trasplantado. Al respecto se considera: **Reactivación:** cuando el receptor es reactivo, es decir con infección crónica previa al trasplante, en el que se detecte presencia de parásitos en sangre por métodos directos o se detecten parásitos en una lesión por biopsia. Esta definición es independiente de la situación del donante (donante reactivo o no). Las principales manifestaciones clínicas de la reactivación son signos neurológicos (meningitis, encefalitis, accidente cerebrovascular, granuloma), cardíacos (miocarditis, insuficiencia cardíaca, arritmias), dermatológicos (paniculitis). Otros síntomas inespecíficos incluyen fiebre, fatiga, anorexia y diarrea. En estos pacientes, una prueba de PCR positiva puede ser orientadora de una reactivación.

Transmisión por el órgano/células hematopoyéticas: cuando el receptor es no reactivo, con donante reactivo, en el que: a) se detecte presencia de parasitemia por métodos directos de concentración o PCR cuantitativa, b) se detecten parásitos en una lesión por biopsia, y/o c) se demuestre seroconversión positiva. En el caso del trasplante de células hematopoyéticas se considera un período mínimo de 30 días y hasta 60 días postrasplante para definir una primoinfección. Desde el punto de vista clínico, todo paciente trasplantado con riesgo de reactivación o de infección aguda debe ser controlado periódicamente por métodos parasitológicos directos por concentración. Se recomienda realizar controles semanales durante los 3 primeros meses, mensualmente hasta el año y bianual posteriormente. Se sugiere además, siempre que fuera posible y se encuentre disponible, sumar la PCR a los métodos directos. En el caso de pacientes con PCR positiva antes del trasplante se sugiere utilizar para el monitoreo de una eventual reactivación la PCR cuantitativa para evaluar el incremento de la carga parasitaria post-trasplante. En estos pacientes, se recomienda volver al esquema de seguimiento inicial (con controles semanales) en toda situación clínica de etiología no aclarada que sea compatible con reactivación de una infección crónica (por ejemplo síndrome febril prolongado). En casos de receptor no reactivo y donante vivo reactivo, se recomienda, de ser posible, realizar tratamiento al donante durante al menos 30 días (idealmente 60 días) previos al trasplante, a fin de disminuir la carga parasitaria y el riesgo de transmisión al receptor. La imposibilidad de realizar este tratamiento en el donante no contraindica el trasplante. Además, durante el trata-

miento se recomienda realizar un seguimiento parasitológico por métodos de concentración para demostrar la efectividad del tratamiento.

Otras condiciones de inmunodeficiencia: Se debe realizar serología para *T. cruzi* con el objetivo de detectar una infección crónica previo al inicio de todo tratamiento quimioterápico en oncología, o tratamiento inmunosupresor en reumatología. En los pacientes con grave compromiso de su inmunidad y con infección crónica por *T. cruzi*, se recomienda realizar monitoreo clínico, serológico y parasitológico por técnica de concentración en sangre en forma periódica. La conducta indicada ante el diagnóstico de una reactivación de la infección por *T. cruzi* es realizar el tratamiento específico considerando al caso como una forma aguda de la enfermedad.

2.4 Evaluación general del paciente y tratamiento

En todo paciente con infección aguda por *T. cruzi* se deberá realizar un examen clínico para detectar posibles manifestaciones que requieran tratamiento sintomático, además del tratamiento antiparasitario específico. Se deberá realizar interrogatorio y examen físico completos. Adicionalmente se recomienda la realización como mínimo de un electrocardiograma (ECG), una teleradiografía de tórax y un laboratorio incluyendo hemograma, eritrosedimentación, creatinina o urea, y hepatograma. Estos últimos estudios permitirán realizar un monitoreo de seguridad del tratamiento farmacológico. La realización de otros estudios complementarios debe ser guiada por la presencia de signos y síntomas, así como de la capacidad instalada del centro asistencial. Debe tenerse en cuenta que la realización de estudios cardiológicos no debe retrasar el inicio del tratamiento. El objetivo principal del tratamiento en la fase aguda de la infección consiste en la eliminación del parásito mediante el tratamiento parasitario específico. Debido a que el tratamiento tripanocida comparte características similares en todas las fases de la infección por *T. cruzi*, independientemente de la vía de transmisión, el tratamiento específico se describe en forma global. Se debe recordar además que se deben suministrar todas las medidas de soporte y control sintomático necesarias dependiendo de la presentación clínica y las manifestaciones que presente el paciente con infección aguda.

Tratamiento etiológico tripanocida

El tratamiento etiológico tiene objetivos a nivel individual y colectivo.

A nivel individual:

- Prevenir lesiones viscerales o disminuir la probabilidad de progresión de la lesión establecida.
- Curar la infección.

A nivel colectivo:

- Disminuir la posibilidad de transmisión del *Trypanosoma cruzi* por todas sus vías.

El tratamiento tripanocida en la fase aguda (vertical, vectorial, transfusional, postrasplante) reduce la gravedad de los síntomas y acorta el curso clínico y la duración de la parasitemia detectable. La cura parasitológica (demostrable por negativización de la parasitemia y de la serología) es superior al 80% en fase aguda vectorial y más del 90% en los casos congénitos tratados durante el primer año de vida. En el caso de reactivaciones en pacientes con infección por VIH, que conlleva una alta mortalidad, el tratamiento tripanocida administrado en forma temprana mejora el pronóstico. En pacientes trasplantados con reactivación, la terapia tripanocida anticipada (tratamiento con parasitemia positiva sin síntomas de reactivación) y

el tratamiento precoz de la reactivación con síntomas reduce la morbilidad y mortalidad asociadas. En niños y adolescentes con infección crónica el tratamiento tripanocida es en general bien tolerado y ha demostrado una alta tasa de curación de la infección, demostrable por la seroconversión negativa. Todas las guías y recomendaciones actuales coinciden en indicar que los niños y adolescentes con Chagas crónico deben ser tratados lo más precozmente posible dado que presentan menos efectos adversos y mejor respuesta terapéutica. Un beneficio adicional del tratamiento en esta población sería la reducción subsecuente del riesgo de Chagas congénito en la descendencia de las niñas tratadas y el aumento del número de potenciales donantes de sangre y órganos. En adultos con infección crónica el tratamiento etiológico también ha demostrado asociarse a seroconversión negativa sugiriendo la curación de la infección, aunque la tasa observada es menor que en niños y adolescentes, y el tiempo requerido hasta la seroconversión es mucho mayor. Adicionalmente, el tratamiento tripanocida en adultos menores de 50 años con infección crónica y con lesión cardiológica incipiente reduciría la progresión a estadios clínicos más avanzados. Sin embargo, el tratamiento etiológico en este grupo de pacientes es en general menos tolerado que en niños y adolescentes. El uso de tratamiento tripanocida en pacientes con lesión orgánica moderada o grave es todavía motivo de investigación.

Indicaciones del tratamiento tripanocida: Previo al inicio del tratamiento es muy importante que el médico le explique al paciente los posibles efectos adversos y las medidas terapéuticas para contrarrestar los mismos. El tratamiento a cualquier edad debe ser adecuadamente supervisado. A continuación se resumen las recomendaciones generales (*Guías para la atención al paciente con Enfermedad de Chagas año 2012*) sobre el uso del tratamiento tripanocida para distintos grupos de pacientes, las cuales fueron alcanzadas por consenso del grupo de revisión de las presentes guías. Dichas recomendaciones se agrupan en 4 categorías, siguiendo la clasificación propuesta por el grupo GRADE.

Hacer: se agrupan en esta categoría aquellas indicaciones para el uso de drogas tripanocidas en las que se considera que la gran mayoría de las personas con información adecuada acuerda en realizar. Se incluyen en esta categoría:

- Fase aguda de cualquier naturaleza (se incluye la reactivación en inmunocomprometidos).
- Fase crónica en niños y adolescentes menores a 19 años.
- Donante vivo reactivo en trasplante de órganos cuando el mismo no es de urgencia.
- Accidente de laboratorio o quirúrgico con material contaminado con *T. cruzi*.

Probablemente hacer: se incluyen en esta categoría aquellas indicaciones para el uso de drogas tripanocidas en las que se considera que la mayoría de las personas con información adecuada acuerda en realizar, pero en las que una minoría substancial podría no acordar. Se incluyen en esta categoría:

- Fase crónica, forma sin patología demostrada en pacientes ≥ 19 años y menores de 50 años.
- Fase crónica, forma con patología demostrada, con hallazgos de cardiopatía incipiente, en pacientes ≥ 19 años y menores de 50 años.
- Quimioprofilaxis secundaria luego de una reactivación en paciente inmunocomprometido.

Probablemente no hacer: se incluyen en esta categoría indicaciones para el uso de drogas tripanocidas en las que se considera que la mayoría de las personas con información adecuada acuerda en no realizar, pero en las que una minoría substancial consideraría hacerlo. Se incluyen en esta categoría:

- Fase crónica en pacientes ≥ 50 años.

- Fase crónica con cardiopatía avanzada.

No hacer: se incluyen en esta categoría indicaciones para el uso de drogas tripanocidas en las que se considera que la gran mayoría de las personas con información adecuada acuerda en no realizar. Se incluyen en esta categoría: • Pacientes embarazadas y durante la lactancia. • Insuficiencia renal o hepática graves. • Trastornos neurológicos graves de base.

Drogas tripanocidas Actualmente sólo existen dos drogas autorizadas para el tratamiento etiológico: Benznidazol y Nifurtimox.

Benznidazol: Se presenta en comprimidos bibranurados de 50 y 100 mg. En otros países de la región existen presentaciones dispensables de 12,5 mg, las cuales pueden estar disponibles en el futuro para su uso en Argentina. Dosis: Todas las edades: 5-7 mg/kg/día, administrados en dos tomas diarias (cada 12 horas) luego de las comidas. Se sugiere una dosis máxima de 400 mg/día.

Nifurtimox: Se presenta en comprimidos bibranurados de 120 mg. Dosis: • Recién nacido y hasta los dos meses de vida: 10-12 mg/kg/día, administrados en dos tomas (cada 12 horas). • Lactantes, primera y segunda infancia: 10-12 mg/kg/día, administrados en tres tomas (cada 8 horas). • Adolescentes y adultos: 8 – 10 mg/kg/día (máximo 700 mg en 24 horas), administrados en tres tomas (cada 8 horas). Las tomas deben administrarse luego de las comidas. En prematuros o niños de bajo peso se recomienda iniciar el tratamiento con dosis bajas de la droga seleccionada, la que puede administrarse en una sola toma diaria. Luego se puede aumentar la dosis cada 48 a 72 horas, realizando control de hemograma hasta alcanzar la dosis terapéutica.

Tanto con Benznidazol como con Nifurtimox, la duración del tratamiento recomendada es de 60 días. Ante el caso de intolerancia al medicamento que impida completar los dos meses, se puede considerar aceptable si cumplió al menos 30 días. En caso de suspender el tratamiento por la presencia de eventos adversos antes de los 30 días, y luego de controlados los mismos, se recomienda comenzar un nuevo tratamiento con la droga no utilizada.

3 Diagnóstico de la infección por *T. cruzi*

3.1 Diagnostico parasitológico

3.1.1 Técnicas directas:

La confirmación de la infección en fase aguda:

La primera elección es demostrar la presencia del parásito por métodos parasitológicos directos. Entre estos, los métodos de concentración en una muestra de sangre son los indicados debido a la sensibilidad adecuada ante el nivel de parasitemia existente en esta fase, y a que pueden ser realizados en laboratorios de baja complejidad.

Los métodos de concentración que pueden utilizarse, en orden de menor a mayor complejidad son:

- Gota fresca: examinación microscópica de una gota de sangre fresca anticoagulada permitiendo la observación del rápido movimiento del tripomastigote de *T. cruzi* (Siqueira-Batista y col, 1994) .Es necesaria la examinación de por lo menos 100 campos microscópicos para llegar a la conclusión de la ausencia de los parásitos.

- Micrométodo con capilares (Técnica de microhematocrito): se emplea en recién nacidos, cuando se dispone de poca sangre; consiste en colocar la sangre en uno o más capilares heparinizados, y someterlos a centrifugación en la microcentrífuga. En la interfase entre el empaquetado de hematíes y el plasma, se encuentra una capa de leucocitos, en la que se observan los movimientos del flagelado al microscopio con ocular de 10x y objetivo de 40 aumentos. Alternativamente, se puede cortar el capilar en la interfase y poner el contenido sobre un portaobjetos para realizar la observación al microscopio como si fuese examen en fresco. Ha sido demostrada la mayor sensibilidad y rapidez en la detección del *T. cruzi* por microhematocrito con respecto a la gota fresca (Freilij y col., 1983).
- Micrométodo con microtubo: (De Rissio y col., 2009) Es la técnica utilizada en reemplazo del microhematocrito, ya que evita los riesgos de lesión al cortar los capilares de vidrio para las muestras de sangre. Se colecta sangre anticoagulada en tubos eppendorf de 2 ml, se realiza centrifugación y luego se observan 12 gotas de sangre de la interfase entre porta y cubreobjetos en aumento de 40x.
- Strout: (Strout, 1962), consiste en la colecta de sangre (mínimo 3,0 ml) sin anticoagulante, dejando el tubo a 37°C durante dos horas para la debida formación y retracción del coágulo. Si existen parásitos, migrarán para fuera del coágulo. El suero exudado se transfiere a otro tubo, el que se centrifuga suavemente (5 min a 50 g, aproximadamente 400 rpm), de lo cual queda un sobrenadante más claro, que se transfiere a un segundo tubo y se somete a centrifugación, ahora intensa (10 min a 400 g, aprox. 2.000 rpm). El sobrenadante, constituido por suero límpido, se desprecia y se hace una preparación en fresco del sedimento.

En casos de pacientes con síntomas neurológicos, toda vez que se pueda, también se debe buscar la presencia de parásitos en líquido cefalorraquídeo.

3.1.2 Técnicas indirectas

Los métodos indirectos parasitológicos son los menos utilizados ya que requieren mucho tiempo, personal altamente especializado y un laboratorio adecuado. Solo se utilizan en centros de referencia, éstos permiten la multiplicación de los parásitos de la muestra. A continuación una breve descripción de los mismo:

- Xenodiagnóstico: este método se basa en la amplificación del parásito dentro del vector alimentado con sangre del paciente. Se utilizan ninfas de triatominos no infectados y la observación al microscopio del contenido intestinal se realiza entre 30 y 45 días después de la ingestión. La sensibilidad del método durante la fase crónica puede llegar al 60% (Schenone y col, 1999, Portela-Lindoso y col., 2003).
- Hemocultivo: consiste en cultivar muestras de sangre del paciente. Los cultivos son analizados al microscopio a los 20, 30 y 45 días buscando formas epimastigotes (Chiari y col., 1999). En la fase aguda, su sensibilidad puede alcanzar el 100%. Durante la fase crónica, presenta niveles de sensibilidad inferiores al xenodiagnóstico, pero permite aislar más fácilmente cepas del parásito.
- Inoculación en animales sensibles: se utiliza principalmente ratones o cobayos, se los inocula con sangre del paciente tratada con anticoagulantes o con la porción de la “capa blanca”. El período de observación de la sangre del animal es a partir de 3-4 semanas. (Pifano y col., 1954).

3.2 Diagnóstico serológico

Por ser el *Trypanosoma cruzi* un protozooario extremadamente antigénico, a los pocos meses de ocurrida la infección existe una respuesta inmune humoral eficaz para controlar el aumento de

la parasitemia, mediada por anticuerpos líticos y enzimas del sistema de complemento.

Existen anticuerpos contra diferentes antígenos de *T. cruzi* (de superficie, somáticos y de excreción), que pertenecen a diferentes clases (IgG, IgA, IgM) y subclases (Rottenberg y col., 1991). Los más frecuentes, y que se encuentran en mayor concentración, pertenecen a la clase IgG, subclases IgG1 e IgG3. Los anticuerpos sintetizados contra diferentes componentes del parásito sirven, de forma indirecta, para el diagnóstico serológico.

Las IgGs pueden detectarse antes de los 30 días de ocurrida la infección aguda, alcanzando su nivel máximo al tercer mes.

Con el fin de detectar IgG se pueden emplear los siguientes métodos diagnósticos:

- Ensayo inmuno-enzimático (ELISA).
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- Hemoaglutinación indirecta (HAI).
- Aglutinación con partículas de gelatina.

En algunos casos en particular (reactivaciones cerebrales, lesiones dérmicas), la biopsia es de gran utilidad para establecer el diagnóstico.

Diagnóstico de fase crónica El diagnóstico de la fase crónica de la infección por *T. cruzi* se confirma al demostrar la respuesta inmunológica del huésped frente al parásito. Para ello deberán realizarse al menos dos reacciones serológicas normatizadas de principios distintos, que detecten anticuerpos diferentes. Ambas pruebas deben realizarse con la misma muestra de suero, siendo necesario además utilizar por lo menos una de las pruebas de mayor sensibilidad como ELISA o IFI. Para considerar el diagnóstico como definitivo (ya sea confirmando o descartando una infección crónica), el resultado de ambas pruebas debe ser coincidente (ambas reactivas o ambas no reactivas). En caso de discordancia (una prueba reactiva y otra no reactiva) se deberá realizar una tercera prueba, o derivarla a un centro de referencia. Se debe tener presente que el valor diagnóstico de las pruebas serológicas debe interpretarse con cuidado en las siguientes situaciones:

- Inmunodepresión o inmunosupresión que anula o compromete la respuesta inmunológica del huésped, lo cual puede conducir a un resultado falsamente no reactivo.
- Luego de completado el tratamiento tripanocida. En este caso, la respuesta inmunológica puede persistir por años luego de eliminado el parásito, por lo que un resultado serológico reactivo no significa fracaso terapéutico ni persistencia de la infección crónica.

4 Deteccion y tipificación de T. cruzi mediante métodos de amplificación génica:

4.1 Reacción en cadena de la Polimerasa o PCR: La reacción en cadena por la enzima polimerasa (PCR de sus siglas en inglés) es una técnica que permite la amplificación in vivo de fragmentos de ADN del parásito que puede realizarse en centros que cuenten con infraestructura adecuada (mayor complejidad). Sin embargo, debido a su mayor sensibilidad en comparación con los métodos de concentración, la PCR puede ser positiva en una infección crónica. La seroconversión positiva entre dos análisis con 30 a 90 días de intervalo puede también servir como

diagnóstico confirmatorio de fase aguda si no puede realizarse la parasitemia. Sin embargo, se debe recordar que la seroconversión tiene menor valor en el diagnóstico de fase aguda en pacientes con tratamientos o enfermedades que generen inmunosupresión o inmunodepresión.

El diagnóstico de enfermedades infecciosas basado en la detección de ácidos nucleicos está reemplazando gradualmente, o complementando, a los ensayos bioquímicos, inmunológicos y a aquellos basados en cultivo, en los laboratorios de microbiología (Espy y col., 2006; Jannes y De Vos, 2006). El método más comúnmente utilizado es el de PCR. Esta técnica se basa en el principio de amplificación exponencial de la secuencia de ADN específica a la que se dirige la reacción, lo cual le confiere una elevada sensibilidad y especificidad analítica. A continuación se detallan diferentes variantes de la PCR.

PCR convencional. Se utiliza un par de oligonucleótidos para amplificar una parte pequeña del genoma del agente infeccioso. La detección del producto de reacción se realiza normalmente en geles de agarosa. Es factible mejorar la sensibilidad y especificidad analíticas mediante la aplicación de la PCR anidada, o utilizando el método de Southern blot seguido de la hibridación de sondas específicas.

PCR multiplex. Se utilizan múltiples pares de oligonucleótidos dirigidos a diferentes blancos moleculares en un único ensayo. Se pueden detectar y diferenciar de forma simultánea varios agentes infecciosos o secuencias genómicas en un único tubo de reacción.

PCR anidada. Se utilizan dos ciclos de amplificación, con pares de oligonucleótidos diferentes. Los productos de la primera tanda de amplificación se utilizan como molde inicial para la segunda tanda, utilizando uno (semi-anidada o HN, del inglés “hemi-nested”) o dos oligonucleótidos diferentes a los utilizados en el primer ciclo. En general, los ensayos de PCR anidada proporcionan una sensibilidad y especificidad analíticas superiores en comparación a las pruebas de PCR convencional.

PCR en tiempo real (qPCR). Utiliza agentes intercalantes fluorescentes o sondas, que permiten el seguimiento continuo de la reacción durante el proceso de amplificación. Para ello, se utiliza un termociclador con sensores de fluorescencia, lo que permite medir la tasa de generación de uno o más productos específicos (Mackay, 2004). Dicha medición se realiza luego de cada ciclo de amplificación, y es por ello que se le denomina PCR en tiempo real. Bajo condiciones ideales, estos productos se acumulan de manera exponencial (sus cantidades se duplican en cada ciclo de temperaturas). El número de ciclos de PCR en el que la acumulación de producto supera un umbral fijo se denomina “ciclo umbral” (Ct) (Higuchi y col., 1993). En las técnicas de qPCR se pueden emplear fluorocromos no específicos o sondas moleculares dependientes de la secuencia. En las técnicas basadas en fluorocromos inespecíficos, como el SYBR Green, un agente intercalante permite detectar la generación de ADN de doble cadena (Zipper y col., 2004). Estas técnicas poseen la ventaja de requerir solo un par de oligonucleótidos para efectuar la amplificación, lo que abarata su costo. Sin embargo, solo es posible amplificar y cuantificar un único producto en cada reacción. Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan al menos un oligonucleótido marcado, lo cual incrementa la especificidad del ensayo. Una de las tecnologías más ampliamente utilizadas es la de las sondas TaqMan, donde la amplificación de productos de PCR se mide mediante un sistema en el cual la sonda que hibrida específicamente con el producto de PCR, se encuentra marcada con dos fluorocromos (Figura I4): un fluoróforo reportero en el extremo 5' y una molécula que bloquea la emisión de fluorescencia del primero, en el extremo 3' (denominada en inglés “quencher”). De este modo,

cuando se efectúa la reacción (con un par de oligonucleótidos y la sonda específicos), la sonda hibrida con el amplicón. En una primera instancia, no hay emisión de fluorescencia debido a la cercanía del fluoróforo reportero con el “quencher”. Cuando la polimerasa se encuentra con la sonda, la hidroliza mediante su actividad exonucleasa 5’-3’, provocando la separación física entre el “quencher” y el fluorocromo reportero, y la consecuente emisión de fluorescencia (Figura I4). Esta emisión se encuentra cuantitativamente asociada a la cantidad de amplicón producido (Heid y col., 1996). Una gran ventaja sobre los colorantes inespecíficos es que distintas sondas, marcadas con fluoróforos que emiten a diferentes longitudes de onda, se pueden combinar para detectar varios productos en una misma reacción. La qPCR tiene diversas ventajas, en comparación con los métodos clásicos de PCR convencional o anidada. En primer lugar, el riesgo de contaminación cruzada por amplicones de corridas anteriores es mucho más bajo ya que la detección del producto de amplificación se realiza sin necesidad de abrir el tubo. Asimismo, se reduce el tiempo necesario para la realización de la técnica, permite la automatización mediante la utilización de placas y la realización de ensayos cuantitativos (Jannes y De Vos. 2006). La PCR cuantitativa se basa en la premisa teórica de que existe una relación log-lineal entre la cantidad de ADN blanco de partida y el valor de Ct, pudiéndose utilizar para estimar la concentración inicial de un blanco de ADN en una muestra desconocida. Para estimar la concentración de ADN a partir de los valores de Ct se utilizan estrategias de cuantificación relativa y absoluta. El enfoque de cuantificación relativa mide el cambio en la concentración de ADN blanco en relación con otra muestra de referencia, y es ampliamente utilizado en estudios de expresión génica. La cuantificación absoluta se consigue utilizando una curva estándar construida con cantidades conocidas de ADN blanco. Para ello, se requiere determinar la cantidad exacta de un estándar por medios independientes como la espectrofotometría, la utilización de colorantes intercalantes como PicoGreen, o el recuento del microorganismo (Sivaganesan y col., 2008).

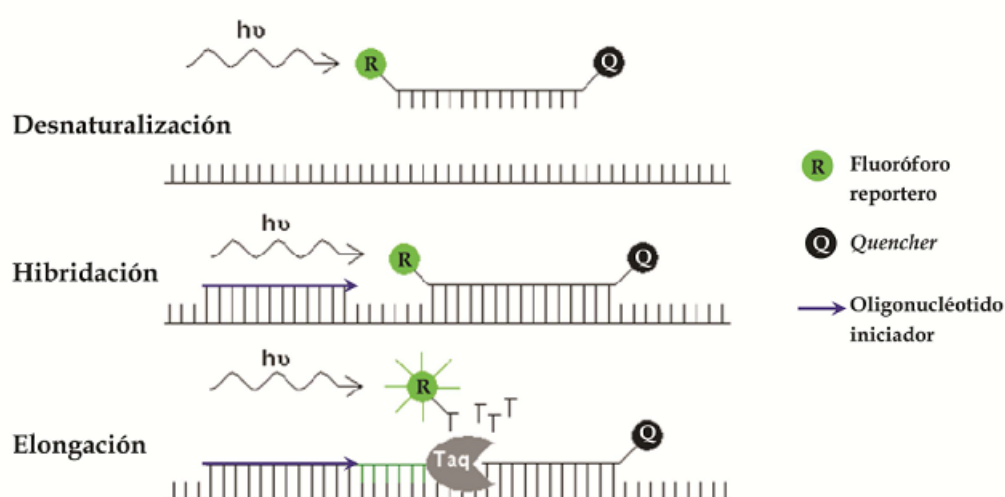


Figura N° 5. Esquema del mecanismo de amplificación de PCR en tiempo real utilizando sondas TaqMan para la detección del producto de reacción.

Otros métodos de amplificación. Además de la PCR, se están desarrollando muchos métodos nuevos para la detección molecular de patógenos, entre los que se encuentran los métodos de amplificación isotérmica: NASBA (amplificación basada en la secuencia del ácido nucleico) y LAMP (amplificación isotérmica mediada por asas). También, se están evaluando otros enfoques para detectar y analizar los productos de la PCR, tales como la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI, del inglés “Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization”) y LUMINEX.

4.2 PCR para la detección de *T. cruzi*

Los procedimientos de PCR han demostrado alto niveles de sensibilidad y especificidad, dependiendo de un número de factores técnicos tales como, el volumen de la muestra extraída, las condiciones de conservación de la misma, el método usado en la extracción de ADN, los primers usados en la amplificación, los reactivos empleados y las condiciones de termociclado. La variabilidad de la PCR puede también en parte ser explicada por la presencia intermitente y la cantidad de parásitos circulantes a la hora de tomar la muestra sanguínea. Por otro lado el diagnóstico molecular de diferentes laboratorios utiliza diferentes blancos moleculares, que en cepas pertenecientes a diferentes Unidades Discretas de Tipificación (UDTs,) presentan un número variable de copias (Duffy y col, 2009; Vargas y col, 2004; Lewis y col, 2009).

Los polimorfismos de secuencia dentro de los fragmentos amplificados entre cepas de diferentes UDTs pueden influir en la eficiencia de la amplificación. (Telleria y col, 2006; Jenne y col, 2010).

También pueden presentarse resultados falsos negativos debido a la interferencia de sustancias inhibitoras de PCR que son co-purificadas durante los procesos de extracción de ADN de muestras sanguíneas, como también falsos positivos debido en su mayoría a contaminación por arrastre de amplicones. (Duffy y col, 2009; Ehrlich-Greenberg, 1994).

Mediante la técnica de PCR se amplifican secuencias específicas del ADN del parásito presente en la muestra. *T. cruzi* presenta un genoma de 100-200 x10⁶ pares de bases (pb), variable según los diferentes aislamientos y UDTs, compartimentalizado entre el núcleo y el cinetoplasto. Por sus cualidades de abundancia, longitud y estabilidad de secuencia, diversas regiones nucleares y del cinetoplasto han sido utilizadas como blanco de amplificación en las reacciones de PCR. La elección de la secuencia a amplificar es fundamental para poder desarrollar un ensayo con alta especificidad y sensibilidad. La secuencia específica de *T. cruzi* con mayor número de repeticiones en el genoma nuclear es la secuencia de ADN satélite (ADN-Sat), una secuencia conservada, organizada en serie, con unas 104 a 105 copias por genoma; no obstante, su contenido varía de 5 a 10 veces entre las UDTs TcI/TcIV y las UDT TcII/III/V/VI (Duffy y col., 2009). Por otro lado, el ADN del cinetoplasto (ADNk) está compuesto por redes de maxicírculos y minicírculos concatenados, que representan entre un 10 y 20% del ADN total del parásito. *T. cruzi* presenta un número variable de minicírculos por célula, entre 5000 y 10000, según el aislamiento. Ambas secuencias repetitivas son utilizadas como blancos de amplificación para la detección por PCR de la infección por *T. cruzi* (Figura I.7) (Avila y col., 1991; Britto y col., 1995; Sturm y col., 1989; Vago y col., 1996b).

La prueba de PCR ha funcionado con éxito durante la fase aguda de la infección (Antas y col., 1999), y para diagnosticar casos de infección congénita en zonas endémicas y no endémicas (Schijman y col., 2003; Virreira y col., 2003; Bern y col., 2011). También, ha sido utilizada para la detección de la infección en pacientes en edad pediátrica (Wincker y col., 1997) y

en el seguimiento de pacientes con riesgo de reactivación debida a inmunosupresión post-trasplante (Diez y col., 2007).

En la fase crónica de la infección, la PCR ha sido utilizada como herramienta de diagnóstico y en la evaluación de la respuesta a la terapia parasiticida. Sin embargo, los trabajos publicados han informado valores muy heterogéneos de sensibilidad y especificidad, dependiendo del volumen de muestra recolectado, el método de extracción y purificación del ADN, los oligonucleótidos, reactivos y termociclador utilizados, así como de las características epidemiológicas de la población estudiada y de la heterogeneidad del parásito. La baja reproducibilidad y la falta de estandarización han dificultado la práctica de esta técnica con fines diagnósticos. En este sentido, los investigadores de INGEBI encabezaron un estudio que involucró a 26 laboratorios con el objetivo de avanzar en la armonización de las estrategias de PCR utilizadas para el diagnóstico de *T. cruzi*. Como resultado de este estudio, se logró un consenso que permitió dictar recomendaciones y un protocolo armonizado para el diagnóstico de *T. cruzi* mediante PCR (Schijman y col. 2011).

Por otra parte, se han diseñado estrategias de qPCR para *T. cruzi*, con especial interés en proporcionar un marcador indirecto que evalúe la eficacia del tratamiento parasiticida (Piron y col., 2007; Duffy y col., 2009 y 2013; de Freitas y col., 2011; Qvarnstrom y col., 2012, Moreira y col., 2013). Estas estrategias de qPCR están basadas en la detección por SYBR Green o sondas TaqMan, con el objetivo de amplificar las secuencias de ADNSat o de ADNk de *T. cruzi* y de un control interno de amplificación (IAC), añadido a cada muestra antes de la extracción de ADN (Duffy y col., 2009, Moreira y col., 2013, Ramirez y col., 2015).

El empleo de Sybrgreen en la PCR en tiempo real implica que la amplificación de cada blanco deba realizarse en tubos separados, mientras que el uso de sondas TaqMan permite realizar sistemas de qPCR multiplex para cuantificar tanto el ADN de *T. cruzi* como el del IAC en una misma reacción. Estas metodologías han sido utilizadas recientemente en ensayos clínicos, demostrando su utilidad como marcadores subrogantes de falla terapéutica (Molina y col., 2014; Morillo y col., 2015; Alvarez y col., 2015)

En el año 2012 un Consorcio Público Privado conformado por INGEBI-CONICET, ANLIS-MALBRÁN y Laboratorios Wiener SA inició un proyecto (FITS SALUD 001-Chagas) financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, para el desarrollo de un equipo comercial (kit) de PCR en tiempo real multiplex de fabricación argentina para el diagnóstico temprano de Chagas congénito basado en el método qPCR multiplex con sondas TaqMan anteriormente mencionado. La última etapa de dicho proyecto, iniciada en 2015 consistió en la validación en campo de un prototipo de este kit en binomios de mujeres seropositivas y sus recién nacidos en regiones endémicas de nuestro país, incluyendo la ciudad de Resistencia, Chaco. Una parte de estos datos se muestran en la Tabla N°:2 de Resultados como parte de la Tesis doctoral del Dr. Raúl Horacio Lucero presentada en Septiembre de 2017 en la Facultad de Medicina de la UBA.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Áreas de trabajo

Como consecuencia de la elevada sensibilidad de los métodos utilizados para la amplificación del ADN, las técnicas poseen un considerable peligro de contaminación. Para disminuir este riesgo se utilizaron tres áreas físicamente separadas y aisladas una de otra. Estas áreas debieron ser acondicionadas en el LCSPCh ya que no existía previamente ningún laboratorio de Biología Molecular en la institución, y el mismo debió ser creado para este fin.

i) **Área de preparación de reactivos**, en la cual se prepararon y almacenaron los reactivos para las mezclas de reacción de PCR y extracción de ADN. Asimismo, en este sector se prepararon las mezclas de PCR. Esta área permanece cerrada, con fuente de luz UV, y se encuentra destinada exclusivamente para este fin.

ii) **Área de preparación de muestras y extracción de ADN**, en la cual se realizaron los procesos previos a la reacción de amplificación: preparación de la muestra y aislamiento del ADN. En este espacio también se añadieron los templados de ADN a los tubos de PCR. Esta área es cerrada, cuenta con fuente de luz ultravioleta (UV) para descontaminación de pipetas y mesadas, y está destinada exclusivamente al procesamiento de muestras clínicas para PCR.

iii) **Área de amplificación y análisis de productos de PCR**, en donde se realizan la amplificación de los diferentes blancos moleculares y el análisis de los productos de PCR a través de electroforesis, digestión u otros procedimientos.

En cada una de estas zonas de trabajo se utilizaron reactivos y materiales de uso exclusivo para ellas, incluyendo delantales, guantes descartables, micropipetas, puntas con filtro, tubos, agua y reactivos, que no se intercambian con las otras áreas.



Área de preparación de reactivos



Área de preparación de muestras y extracción de ADN

2 Protocolo de extracción de sangre-Guanidina-EDTA

Fundamento:

Los ácidos nucleicos se unen a la superficie de una columna de fibra de vidrio en presencia de una sal caotrópica (Hidrocloruro de guanidina). Esto permite inmovilizar específicamente a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) mientras que se liberan los contaminantes.

Documentos de referencia:

Ver anexo pág. 43

3 Reacciones de amplificación por PCR

3.1 Generalidades

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó un termociclador CFX96 Touch Real Time PCR (BIO- RAD) con seis canales ópticos del Laboratorio central de Salud Pública de la Provincia del Chaco.

Las mezclas de reacción se prepararon de forma “casera” o se utilizaron mezclas comerciales, en un volumen final de 20 μ l, y con las condiciones que se detallan en las siguientes secciones. La detección en tiempo real de los productos se realizó mediante sondas TaqMan.

3.2 Mezclas de reacción y programas de ciclado

Las mezclas de reacción y las condiciones de ciclado se presentan en la Tabla 2.

Procedimientos para detección y cuantificación de carga parasitaria

qPCR-MTq: ensayo de PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *T. cruzi* (secuencia de ADN satélite) y del IAC en una misma reacción “multiplex” utilizando sondas TaqMan (Duffy y col, PLOS NTD, 2013).

Target	Oligonucleótido	Secuencia	Concentración final (μ M)
<i>T.cruzi</i> -ADN satélite	Cruzi 1	5'-ASTCGGCTGATCGTTTTTCCA-3'	0,75
	Cruzi 2	5'-AATTCTCTCCAAGCAGCGGATA-3'	0,75
	Cruzi 3	5'-Fam-CACACACTGGACACCAA-NFQ-MGB-3'	0,05

La reacción se realizó con 5 μ l. del ADN resuspendido, en un volumen final de 20 μ l., utilizando la mezcla de reactivos “FastStart Universal Probe Master Mix” (Roche Diagnostics GmbH Corp, Mannheim, Germany). **Tabla 2.**

Tabla 2: Procedimiento de preparación de la Mezcla de reactivos de qPCR-MTq.

REACTIVO	(μ l.) 1 TUBO	CC. FINAL
AGUA	3	–
MIX ROCHE 2X Fast Start Univ. Probe (ROX)	10	1 X
Primers cruzi 1+ cruzi 2 (15 μ M)+ sonda cruzi 3 (1 μ M)	1	Primers (1 y 2) 0,75 μ M Sonda 0,05 μ M
TOTAL	15	–

Para cada corrida se utilizó un Control Negativo con ADN humano no infectado un Control Negativo de PCR (Non Template Control: reactivos y agua en lugar de ADN), dos Controles Positivos con ADN de la Cepa CL- Brener (1 equiv par/ mL y 100 equiv par/ mL) por duplicado, como se recomienda (Burd, 2010).

Las condiciones de ciclado fueron 10 min a 95° C, 40 ciclos de 15 seg a 95 °C, y 1 min a 58 °C.

4 Controles de calidad de PCR

El ADN de *T. cruzi* para los controles de calidad se preparó a partir de cultivos de epimastigotes (sección 2.1.3). La concentración y calidad del ADN de *T. cruzi* e IAC se midió a 260/280 nm en el equipo Nanodrop, por triplicado. Se prepararon alícuotas de las diluciones de trabajo, que se almacenaron a -20°C hasta su utilización. En cada PCR se incluyó un control negativo (mezcla con H₂O en lugar de ADN); un control positivo débil (1 fg/μl) y uno fuerte (10 fg/μl) de ADN de *T. cruzi* cepa CL-Brener, en los ensayos de diagnóstico; y al menos un control positivo de *T. cruzi* correspondiente a la/las UDTs analizadas (10-100 pg/μl), en los ensayos de tipificación.

4.1 Construcción de curvas estándar para qPCR a partir de muestras de sangre periférica

Recuento de células en la cámara de Neubauer

Los cultivos de epimastigotes de *T. cruzi* correspondientes a las cepas CL-Brener se lavaron para eliminar el ADN de parásitos muertos en el medio de cultivo y se contaron en cámara de Neubauer según el siguiente protocolo:

1. Centrifugar 1 ml del cultivo de *T. cruzi* en fase logarítmica durante 5 min a 3.000 rpm.
2. Descartar el sobrenadante de cultivo y lavar con 1 ml de **PBS**.
3. Agitar con vórtex y centrifugar durante 5 min a 3.000 rpm.
4. Repetir desde el paso 2.
5. Agitar con vórtex durante 15 seg en pulsos (para separar las rosetas) y realizar la dilución adecuada para el recuento en PBS-formaldehído 3,8%.
6. Cargar la cámara con 10 μl de la dilución y realizar el recuento al microscopio (400X) en los 4 cuadrantes de blancos.

Se calculó el número de células de epimastigotes/ml según la siguiente fórmula: Parásitos/ml = (partículas contadas) x (superficie contada (mm²) x profundidad de la cámara (mm) x factor de dilución)/4

4.2 Validación de la linealidad: Protocolo-Guía CLSI EP6

Estimación del rango lineal

Para la evaluación de la linealidad se siguió el protocolo del documento NCCLS EP6-A2 (2003).

El mismo plantea la evaluación polinomial de la linealidad, donde se compara el ajuste de los datos a modelos de primer, segundo y tercer orden. El modelo al que mejor ajusten los datos será aquel que presente tres condiciones de manera conjunta:

- el mayor valor de coeficiente de determinación (R²)
- el menor valor de desvío estándar de la regresión (S_{y,x})
- valores de significación menores a alfa para los estimadores de los coeficientes de regresión

El protocolo además evalúa la repetibilidad por nivel y el error de linealidad. Para esto, se estima la repetibilidad para cada nivel evaluado y se obtiene un valor de repetibilidad global que se compara con el valor más alto de CV% para repetibilidad, obtenido en el ensayo de evaluación de la precisión.

El criterio de aceptación para el error de linealidad o desvío de linealidad se establece a partir del 50% del error total del método (dato también obtenido del ensayo de evaluación de la precisión).

4.3 Paneles de competencia para control externo de calidad

Se dispuso de paneles de muestras de referencia, utilizando como matriz sangre de individuos no infectados tratada con Hidrocloruro de Guanidina 6M-EDTA 0,2M, PH: 8, e inoculada con parásitos de cultivo in vitro (epimastigotes) cuantificados en cámara de Neubauer.

Cada panel se hizo por duplicado: una alícuota fue enviada al Laboratorio de Biología Molecular del LCSPCh y otra alícuota quedó en el laboratorio de control de calidad (INP, Buenos Aires). Estos paneles se analizaron cada 3 meses y se informaron los resultados al laboratorio de control de calidad.

La extracción de cada muestra del panel se realizó por duplicado (un replicado por operador) y la PCR de cada extracto de ADN se realizó por triplicado. Esto permitió observar la concordancia de los resultados informados por cada operador del laboratorio adoptante con los resultados obtenidos por el laboratorio de control de calidad.

La concordancia esperada de los resultados cualitativos (detectable-no detectable) debe ser del 100% en el caso de los controles negativos y en el caso del control positivo fuerte. El control positivo cercano al límite de detección deberá presentar una concordancia mínima del 75% por operador (asumiendo que sólo uno de los cuatro controles positivos de 1 equivalente parasitario/ml puede llegar a ser no detectable).

La Acordancia (probabilidad intralaboratorio) y la Concordancia (probabilidad entre laboratorios) fueron calculados para análisis cualitativo de los resultados de las pruebas de aptitud.

Acordancia: Probabilidad media de encontrar el mismo resultado para dos muestras idénticas analizadas en el mismo laboratorio (por el mismo operador usando el mismo equipamiento)

Concordancia: Probabilidad media de encontrar el mismo resultado para dos muestras idénticas analizadas en laboratorios diferentes (diferente operador usando diferente equipamiento)

La Concordancia Odds Ratio (COR) fue calculada como sigue: $[COR = \frac{\text{acordancia} \times (100 - \text{concordancia})}{\text{concordancia} \times (100 - \text{acordancia})}]$. Se utilizó un procedimiento Bootstrap con error estándar del 95% (Langton et al., 2002).

4.4 Análisis estadístico

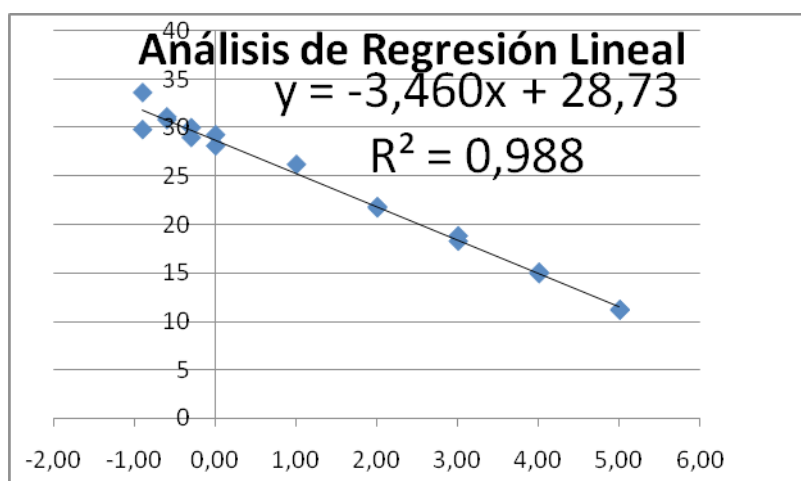
Para la validación analítica de las técnicas diagnósticas se estimaron los parámetros de precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación, siguiendo los procedimientos de los documentos NCCLS EP5A2; EP6A2; y EP17A respectivamente.

Los datos se organizaron en una planilla de cálculo Microsoft Excel (2007) que también se utilizó para hacer relaciones y estimaciones entre las variables. Para las representaciones gráficas se utilizaron GraphPad Prism 4.0 y QuikCalcsc (GraphPad Software, Inc., <http://graphpad.com/quickealcs.cfm>).

RESULTADOS

Curva con muestras preparadas por el laboratorio de Biología Molecular del IMR-UNNE

x (LOG ₁₀ CARGA)	y (ct)	CARGA (equiv par/ml)
-0,90	33,61	0,125
-0,90	29,79	0,125
-0,60	31,1	0,25
-0,60	30,81	0,25
-0,30	29,99	0,5
-0,30	28,97	0,5
0,00	28,11	1
0,00	29,25	1
1,00	26,19	10
2,00	21,69	100
2,00	21,83	100
3,00	18,26	1000
3,00	18,81	1000
4,00	14,9	10000
4,00	15,06	10000
5,00	11,12	100000
5,00	11,21	100000



El análisis de Regresión lineal produjo la ecuación $y = -3,66 x + 29,49$, lo que indica la linealidad del ensayo.

TRANSFERENCIA DE LA METODOLOGIA DE PCR EN TIEMPO REAL EN EL MARCO DEL PROGRAMA NACIONAL DEL INSTITUTO NACIONAL DE PARASITOLOGÍA

El programa de transferencia tecnológica al Laboratorio de Biología Molecular del Laboratorio Central de Salud Pública de la Provincia del Chaco se inició a fines de 2015. En el marco de este programa se llevó a cabo la puesta a punto de la técnica de PCR en Tiempo Real con sondas TaqMan en un termociclador CFX96 Touch (BIORAD,) donado por la Embajada de Japón con intermediación de la Fundación Mundo Sano.

La transferencia comprendió los siguientes aspectos:

- ❖ Planificación edilicia del laboratorio de Biología Molecular: a partir de un laboratorio ya existente se diagramaron refacciones con divisiones de Durlock y puertas internas de manera de separar tres áreas definidas como: Área de extrac-

ción de ADN, Área de preparación de Mix de trabajo para PCR y Área de Amplificación mediante el ciclador CFX96. (Ver Materiales y Métodos, sección 1.)

- ❖ Capacitación por parte de la firma proveedora del ciclador BIO-RAD: mediante un día de capacitación por parte de la representante quien realizó presentación teórica en power point con posterior demostración del funcionamiento del ciclador y manejo del software específico.

- ❖ Capacitación en pedidos de insumos: Se asesoró a la Dirección del laboratorio Central y a la profesional responsable del área en el pedido de descartables y reactivos para el laboratorio de Biología Molecular.

- ❖ Contacto con proveedores de los mismos: se procedió a pasar una lista de contactos para la provisión de insumos de laboratorio.

- ❖ Capacitación en técnicas de extracción de ADN por columnas comerciales: mediante la provisión de kits comerciales por parte del Instituto de Medicina Regional (IMR) y de muestras de casos clínicos reales se llevó a cabo una demostración de la técnica de extracción de ácidos nucleicos a la vez que se realizó una prueba de funcionamiento de los aparatos recibidos (Micropipetas automáticas, centrífugas, baños termostáticos y cabina de seguridad biológica).

- ❖ Confección de reacciones de qPCR a partir de muestras clínicas y de Paneles artificiales de Control de Calidad externo junto con la capacitación en el manejo del ciclador CFX96: Se realizaron los cálculos y preparación de Mix de trabajo a partir de reactivos provistos por el IMR, como también la provisión de controles positivos de reacción de PCR y muestras de ADN extraídas anteriormente en el laboratorio de Biología Molecular del IMR y previamente caracterizadas mediante análisis serológicos y PCR convencional hacia el kADN . En el mismo sentido se analizaron paneles de control de calidad externos provistos por INGEBI y el INP.

- ❖ Confección de Curvas estándar de diluciones seriadas de templados de ácidos nucleicos de concentraciones conocidas provistas por el INP y el IMR.

- ❖ Cálculos de cuantificaciones absolutas de cargas parasitarias a partir de las curvas construidas en el paso anterior.

- ❖ Interpretación de los resultados obtenidos.

Como resultados obtenidos se destaca el Control de Calidad Externo con muestras provistas por el INP, la construcción de la curva estándar a partir de diluciones de parásitos preparados por el laboratorio del INP y la extracción de ADN de muestras clínicas (sangre en guanidina) provistas por el mismo laboratorio, con columnas comerciales y posterior amplificación mediante qPCR con sondas TaqMan aplicando el POE del INP. En la Tabla 1 se muestran los resultados de tales ensayos.

Tabla 1: Primeros resultados de Paneles de Control de Calidad Externo del Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco.

Muestra ADN	Ct-Cruzi	Qty (eq. par./mL)	Cc (eq.par/ml)
A1	33,91	0,89	1,00E+00
	33,73	1,00	1,00E+00
A2	N/A	N/A	NEGATIVO
	N/A	N/A	NEGATIVO
A3	26,26	1,39E+02	1,00E+02
	26,22	1,42E+02	1,00E+02
A4	30,02	1,16E+01	1,00E+01
	30,11	1,09E+01	1,00E+01
A5	34,64	5,50E-01	1,00E+00
	33,59	1,10E+00	1,00E+00
STD 1 eq. par./mL	33,43	1,00E+00	
	34,43	1,00E+00	
STD 10 eq. par./mL	30,5	1,00E+01	
	30,4	1,00E+01	
STD 10 ² eq. par./mL	26,75	1,00E+02	
	26,58	1,00E+02	
STD 10 ³ eq. par./mL	23,13	1,00E+03	
	23,57	1,00E+03	
STD 10 ⁴ eq. par./mL	19,62	1,00E+04	
	19,68	1,00E+04	
NTCa	N/A		
NTCb	N/A		
	Eficiencia%:		
	R²:	R²: 0,997	

Referencias: N/A. No amplificó, NR: No realizado. Carga parasitaria de las muestras de los paneles de control externo: A1 y A5: 1 eq. Par/ml; A2: sangre seronegativa ; A3: 100 eq.par/ml, A4: 10 eq.par/ml.

La corrida de PCR mostró una eficiencia de amplificación excelente (R^2 : 0,997). Los resultados obtenidos resultaron dentro de lo esperado tanto respecto a la determinación correcta de la muestra no infectada (A2), como con respecto a la concordancia en carga parasitaria de las muestras inoculadas con concentraciones conocidas de parásitos (A1, A3, A4 y A5).

DISCUSIÓN

Recientemente la aparición de la PCR ha sido una alternativa a las técnicas convencionales ya que es capaz de detectar parasitemias de muy baja intensidad e incluso fragmentos de parásito. Existen diferentes PCR que utilizan diferentes dianas del parásito como el minicirculo del kADN y la secuencia repetida del ADN satélite. Los diferentes protocolos de PCR permiten detectar el genoma de un solo parásito e incluso cantidades inferiores. En zonas endémicas la PCR sólo se utilizaba en estudios de investigación pero actualmente está sustituyendo otros métodos como el xenodiagnóstico. En países no endémicos la PCR es una herramienta habitualmente utilizada en los bancos de sangre, en el control de posible reactivación postrasplante y en el diagnóstico del Chagas congénito. En pacientes en fase crónica la PCR es una prueba complementaria a la serología, de confirmación y también se utiliza para el seguimiento de curación parasitológica posterior al tratamiento. La PCR se puede realizar sobre diferentes tipos de muestra. En fase aguda sobre sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y a partir de biopsias de tejido cardíaco o bien de placenta o cordón en los casos de congénita. En los casos de Chagas crónica se puede realizar sobre muestras de sangre o plasma, o de capa leucocitaria. Un requisito para mejorar los resultados de PCR es la conservación de la muestra. Es aconsejable conservar la muestra a 4 °C o congelada. En el caso de sangre total, se debe mezclar con tampón guanidina 6 M-EDTA 0.2 M lo antes posible para preservar el ADN. De esta forma se puede conservar a temperatura ambiente o nevera, se produce la hemólisis de los hematíes, se homogeniza el ADN y se inhibe la acción de las ADNasas. En condiciones óptimas la sensibilidad de la PCR en fase crónica es de un 50 %, aunque según el protocolo utilizado los resultados de sensibilidad son variables. Probablemente estas diferencias sean debidas al volumen de sangre procesada, a los procedimientos de extracción del ADN o a la región de ADN de *T. cruzi* amplificada. Dentro de las PCR que se usan la nested PCR proporciona una mayor sensibilidad que la PCR simple. Es una técnica altamente sensible, pero que en cambio consume mucho tiempo y tiene el riesgo de falsos positivos debido a la posibilidad de contaminaciones por amplicones.

DIAGNÓSTICO DEL CHAGAS CONGÉNITO Debe realizarse en aquellos casos en que la madre tiene un diagnóstico de Chagas agudo (poco frecuente en área no endémica) o un Chagas crónico. Hay que tener en cuenta que entre un 60 % y el 90 % de los recién nacidos infectados no presentarán clínica y por lo tanto el diagnóstico, de confirmación, para establecer el tratamiento sólo se podrá hacer mediante pruebas diagnósticas. Al recién nacido se le realizaran las siguientes pruebas:

a) El microhematocrito: Sacar sangre preferentemente del talón. Si el microhematocrito es positivo se confirma la infección y hay que establecer el tratamiento lo más rápidamente posible. Paralelamente se puede realizar el examen en fresco, frotis o gota gruesa. Cuando la parasitemia es baja el microhematocrito puede ser negativo, en estos casos está indicado realizar un cultivo y una PCR a partir de sangre y hacer un seguimiento periódico tanto clínico como parasitológico del niño hasta los 9 meses.

b) Pruebas serológicas: se realizarán siempre que el microhematocrito, el cultivo o la PCR hayan sido negativos. La determinación de anticuerpos específicos se realizará siempre utilizando dos pruebas serológicas validadas. Es importante realizar esta prueba a partir de los 9 meses para evitar la presencia de anticuerpos maternos. Si la serología a los 9 meses es positiva, se confirmará que el niño está infectado y se establecerá el tratamiento. Otras pruebas

que se pueden realizar son la detección de parásitos en placenta por histología o por PCR y en el líquido amniótico, aunque no siempre la detección de *T. cruzi* en estas muestras se puede asociar a una infección congénita.

(Educación continuada en el laboratorio clínico. Comité de educación. M. Rodríguez, D. Balsells y col. 2013. ISSN 1887-6463)

En base a la sensibilidad de los métodos de laboratorio mencionados, es fundamental en Chagas congénito, emplear el test de mayor sensibilidad posible de manera de detectar lo más pronto que se pueda los casos de neonatos infectados para instaurar el tratamiento parasiticida que en la mayoría de los casos logra la negativización de la parasitemia.

En ese contexto, los resultados presentados en la Tesis doctoral titulada:

“Asociación de la variación genética de *Trypanosoma cruzi* con la transmisión congénita y las manifestaciones cardíacas de la infección crónica en áreas de alta prevalencia de la Provincia del Chaco” por el Dr. Raúl Horacio Lucero en la Facultad de Medicina de la UBA en Septiembre de 2017, mostraron que la sensibilidad de qPCR fue de 100% en contraste con el Microhematocrito que demostró un 25% de sensibilidad en un estudio de 78 recién nacidos en el Hospital Julio C. Perrando de la ciudad de Resistencia, Chaco, y que arrojó un 5,12% de infectados de madres seropositivas.

Se estudiaron por PCR 181 muestras de 78 casos. Cuatro de los 78 casos resultaron con diagnóstico de Chagas congénito por el algoritmo estándar de oro (parasitológico en sangre de cordón o muestra de sangre periférica basal y serológico a los 10 meses), evidenciando una tasa de transmisión de 5,12%. Estos cuatro casos resultaron positivos por qPCR y por LAMP, dando un valor de sensibilidad de un 100%, mientras que el micrométodo resultó positivo en solo uno de los cuatro casos congénitos. Cabe aclarar que el único caso con prueba de micrométodo positiva resultó serológicamente no reactivo a los 10 meses, por haber recibido tratamiento etiológico.

La tabla N° 2 muestra resultados de qPCR con Cts < 39, interpretables como PCR positivos según el inserto del kit, que fueron obtenidos en muestras de 11 bebés del estudio de campo. Seis presentaron resultados de qPCR con cargas parasitarias por encima del límite de cuantificación, cuatro de los cuales corresponden a los pacientes con Chagas congénito arriba mencionados, mientras que dos, correspondientes a los casos 4044 y 4047 (casos 4 y 6 en Tabla 2.) presentaron resultado parasitológico negativo y serología no reactiva, debiendo ser interpretados como falsos positivos de la PCR, dando un valor de especificidad del 95%. Sin embargo, uno de estos casos es positivo por LAMP, lo que pone en duda el resultado serológico. No conocemos al momento si estos pacientes recibieron tratamiento etiológico por lo cual no podemos aseverar que estos casos sean o no falsos positivos de la PCR

CASO	ID MUESTRA	Ct Promedio *	Carga T.cruzi	Tipo Muestra	Micrométodo	Serología 10 m	Tratamiento	LAMP
1	4014 PT 12	35,65	0,06	2-12 sem	Neg	NR	S/D	Neg
2	4026 IW 12	37,71	0,02	2-12 sem	Neg	NR	S/D	Neg
3	4043 II 12	38,39	0,01	2-12 sem	Neg	NR	S/D	Ne
4	4044 GB 12	28,84	3,64	2-12 sem	Neg	NR	S/D	Neg
5	4045 ER 10	19,96	1020,76	Sg cordón	Neg	R	S/D	Pos
	4045 ER 11	19,14	1814,79	Sg cordón	Neg			Pos
	4045 ER 12	14,92	23709,00	2-12 sem	S/D			Pos
6	4047 XD 10	25,58	39,06	Sg cordón	Neg	NR	S/D	Pos
7	4051 JQ 12	38,98	0,01	2-12 sem	Neg	NR	S/D	Ne
8	4055 BL 12	25,05	53,35	2-12 sem	Neg	R	S/D	Pos
9	4057 UU 12	23,95	81,96	2-12 sem	Neg	R	S/D	Pos
10	4058 SN 10	27,45	12,96**	Sg cordón	Pos	NR	S/D	Pos
	4058 SN 11	19,56	1369,98	Sg cordón	Pos			Pos
11	4090 WW 12	38,89	0,00	2-12 sem	Neg	Ne	S/D	nE

Tabla N° 2. La carga parasitaria es expresada en eq.par/ml. Tipo de muestra: Sangre de cordón o sangre periférica entre 2-12 semanas. Ne: No evaluado; R: Reactivo; NR No reactivo; nA: No Aplica; S/D sin datos. * Promedio de Cts de duplicados; ** Esta muestra presentó resultados del IAC fuera de rango (Ct>28).

CONCLUSIONES

- Se diseñó y puso en funcionamiento el primer laboratorio de Biología Molecular del LCSPCh.
- Se realizó la estandarización de un método de PCR en tiempo real dirigido a secuencias de ADN satélite con sondas TaqMan, a partir de ADN extraído por el método comercial de columnas de extracción Roche.
- Se implementó un sistema de control externo de calidad de la PCR en tiempo real, mediante el procesamiento de paneles de competencia con excelentes valores de concordancia y acordancia.
- Se transfirió esta metodología con el objeto de ser aplicada en la detección temprana de Chagas Congénito en un área de alta prevalencia de la enfermedad en Argentina.
- Se trabajó en paralelo con el Laboratorio de Biología Molecular del IMR de la UNNE de manera de verificar la validez de los resultados obtenidos tanto de muestras, como de curvas de calibración.

Técnicas montadas en el laboratorio de Biología Molecular del LCSPCh

La ubicación estratégica que tiene el laboratorio de Biología Molecular del LCSPCh y el equipamiento con el que cuenta como también sus instalaciones edilicias, lo convierten en un referente para el estudio de enfermedades infecciosas endémicas en esta zona del país, como es la enfermedad de Chagas. El laboratorio funcionó adecuadamente en técnicas coordinadas con el laboratorio de Chagas del INP, con el cual se creó un importante vínculo de trabajo e intercambio de muestras y técnicas de Biología Molecular entre ambos laboratorios.

Las técnicas que fueron secuencialmente puestas a punto permitirán, por primera vez en la Región, conocer la carga parasitaria de pacientes con enfermedad de Chagas congénito. Se realizó una validación analítica exhaustiva siguiendo Guías Internacionales en el caso de la PCR en Tiempo Real que permite partir de un volumen pequeño de muestra clínica.

1. Control Externo de Calidad en diagnóstico Molecular: Análisis de paneles de competencia

Otro aporte importante de este trabajo lo constituye la participación del Laboratorio de LCSPCh, en un sistema de Control de Calidad Externo que se pudo implementar desde INGEBI para monitorear la calidad de los experimentos de qPCR y el desempeño de operadores, reactivos y equipos. En efecto, el análisis de paneles de competencia permitió realizar pruebas de aptitud de qPCR en el Termociclador CFX96. Los resultados se compararon entre sí y con respecto a los resultados de qPCR realizados por el laboratorio de referencia que preparó los paneles (INP). El porcentaje de Acordancia obtenido fue de 100% (intervalos de confianza 100-100), el de concordancia fue de 100% (IC 100-100) y el COR (*odds radio*) fue de 1, indicando resultados excelentes.

2. Impacto del Trabajo de Tesis en capacidades institucionales y académicas:

Se logró capacitar a dos profesionales del Laboratorio Central de Salud Pública del Chaco para la Transferencia de la metodología de PCR en tiempo real con sondas TaqMan de manera de ingresar al Programa Nacional de pesquisa de Chagas Congénito, coordinado por el INP Dr. Fatala Chaben.

ANEXOS

INP Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén"

201 6

Título: PROCEDIMIENTO PARA LA EXTRACCIÓN DE MATERIAL GENÉTICO (ADN) DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CHAGAS	POE N°: PU-001-01
	Páginas: 5

Redactado por: Carolina I. Cura Juan Carlos Ramírez Constanza Lopez Albizu Instituto: INP "Dr. Mario Fatała Chabén" Departamento o Servicio: Diagnóstico Fecha: 20-10-14	Revisado por: Karenina Scollo Sergio Sosa Estani	Autoridad de aprobación: Sergio Sosa Estani
---	---	---

REVISION PERIODICA POR LA AUTORIDAD DE APROBACION					

Versión original: PU-001-01 Fecha de vigencia del original: 14-11-14	Actualización N°: 1 Fecha de vigencia: 10-08-16
---	--

1. Propósito:

Describir el proceso a seguir para la obtención de ADN a partir de muestras de sangre de pacientes con enfermedad de Chagas para su posterior evaluación por qPCR.

Los objetivos específicos son:

- Verificar la calidad de la muestra recibida en el laboratorio.
- Codificar y almacenar la muestra hasta el momento de su extracción.
- Realizar la extracción de ADN por método en columna (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche).
- Almacenar el ADN hasta el momento de su procesamiento por qPCR.
- Aplicar las normas de bioseguridad en todo el procedimiento.

2. Responsables:

Son responsables del cumplimiento de este POE los usuarios del laboratorio y todos aquellos profesionales que realicen estudios vinculados al proyecto de validación y transferencia de metodologías de qPCR para el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* coordinado por el Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chabén".

3. Definiciones:

Verificar vigencia de todos los documentos antes de su aplicación. Los mismos se distribuyen como copias no controladas.

INP Instituto Nacional de Parasitología "Dr. Mario Fatała Chaben"

2016

ADN: Ácido desoxirribonucleico.
 ARN: Ácido ribonucleico.
 GE: Buffer Guanidina 6 M-EDTA 0,2 M (pH 8,00).
 GEB: muestra de sangre mezclada con buffer GE en relación 1:1.
 qPCR: PCR en tiempo real.

4. Instrucciones:

4.1. Fundamento:

Los ácidos nucleicos se unen a la superficie de una columna de fibra de vidrio en presencia de una sal caotrópica (Hidrocloreto de guanidina). Esto permite inmovilizar específicamente a los ácidos nucleicos (ADN y ARN) mientras que se liberan los contaminantes.

4.2. Documentos de referencia:

- POTDD: 002-001 Procedimiento Operativo Estándar para muestras derivadas al departamento de diagnóstico INP "Dr. Mario Fatała Chaben".
- Manual de instrucciones High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche).

4.3. Condiciones de seguridad:

- Manipular todas las muestras como si fueran potencialmente infecciosas, utilizando procedimientos seguros de trabajo en laboratorio.
- No comer, beber o fumar en el área de trabajo del laboratorio.
- No pipetear con la boca.
- Usar guantes desechables de protección y guardapolvo al manipular muestras y reactivos.
- Lavar bien las manos después de manipular muestras y reactivos.

4.4. Operaciones preliminares:

4.4.1. Materiales:

- Kit de extracción comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche)
- Puntas con filtro para micropipetas de 1000, 200 y 20 µL
- Gradilla para tubos de 1,5 mL y 50 mL
- Tubos eppendorf de 1,5 y 2 mL (con doble seguro)
- Tubos Falcon de 50 mL
- Abridor de tubos eppendorf
- Guantes de látex sin talco
- Recipientes para el descarte de material biológico
- Marcador indeleble fino

4.4.2. Equipos:

- Microcentrifuga (con rotor para tubos eppendorf de 1,5 mL)
- Vortex
- Baño térmico seco (70°C)
- Micropipetas automáticas de volumen variable 2-20 µL
- Micropipetas automáticas de volumen variable 20-200 µL
- Micropipetas automáticas de volumen variable 100-1000 µL
- Cabina de trabajo con luz UV

4.4.3. Reactivos y soluciones:

- Hipoclorito de sodio 10% recién diluido
- Etanol absoluto

Verificar vigencia de todos los documentos antes de su aplicación. Los mismos se distribuyen como copias no controladas.

- Isopropanol

4.4.4. Muestras:

Muestras de GEB homogéneas, sin coágulos y con adecuada codificación. Incluir una muestra de GEB proveniente de individuos seronegativos como control negativo de extracción.

4.5. Procedimiento:

4.5.1. Procedimientos previos a la extracción de ADN

- Para cada nuevo kit, preparar la proteinasa K según las indicaciones del inserto, alicuotar 40 μ L en tubos eppendorf de 2 mL y almacenar a -20 °C hasta su uso. Preparar la solución removedora de inhibidores según las indicaciones del inserto. De la misma manera para la solución de lavado, pero con el agregado de 85 mL de Etanol absoluto. Realizar estos procedimientos en el área limpia de preparación de mix y reactivos.
- Desinfectar el área de trabajo (área de extracción de ADN) limpiando las superficies con paño humedecido con hipoclorito de sodio 10% recién diluido: mesadas, pipetas, equipos, etc.
- Encender la luz UV del área de trabajo durante 15 min.
- Atemperar las muestras y el control negativo. Verificar códigos y cantidades.
- Calentar el baño seco a 70°C
- Alicuotar en tubos Falcon las cantidades de reactivos de extracción necesarias: 100 μ L de solución de pegado, 100 μ L de isopropanol, 500 μ L de solución removedora de inhibidores, 1 mL de solución de lavado y 100 μ L de solución de elución por muestra.
- Tomar 1 tubo eppendorf de 2 mL (proteinasa K), 3 tubos eppendorf de 1,5 mL, 4 tubos de recolección de 2 mL (provistos por el Kit) y 1 columna por muestra. Rotular con el código correspondiente con un marcador indeleble.
- Homogeneizar las muestras y el control negativo con vortex o inversión durante 15 segundos.
- Registrar el procedimiento de extracción, fecha, operador y códigos de las muestras en el cuaderno de trabajo del laboratorio.

4.5.2. Protocolo de extracción de ADN (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche)

1. Agregar 40 μ L de proteinasa K y 100 μ L de solución de pegado en un tubo eppendorf de 2 mL por cada muestra a extraer.
2. Agregar 300 μ L de cada muestra (GEB) a su correspondiente tubo.
3. Mezclar bien haciendo pulsos en vortex durante 15 segundos y centrifugar brevemente (spin) a 8000 rpm a temperatura ambiente.
4. Incubar a 70 °C durante 10 minutos en baño seco y realizar un spin.
5. Agregar 100 μ L de isopropanol, mezclar en vortex durante 15 segundos y realizar un spin.
6. Aplicar cada mezcla a su correspondiente columna de extracción con tubo de recolección de 2 mL.
7. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Colocar la columna de extracción en un nuevo tubo de recolección y descartar el tubo anterior con el filtrado en un recipiente de descarte sin Hipoclorito de sodio 10%.

8. Agregar 500 µL de solución removedora de inhibidores a cada columna.
9. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Colocar la columna de extracción en un nuevo tubo de recolección y descartar el tubo anterior con el filtrado en un recipiente de descarte sin Hipoclorito de sodio 10%.
10. Agregar 500 µL de solución de lavado a cada columna.
11. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Colocar la columna de extracción en un nuevo tubo de recolección y descartar el tubo anterior con el filtrado en un recipiente de descarte sin Hipoclorito de sodio 10%.
12. Repetir pasos 10 y 11. Colocar la columna de extracción en un tubo eppendorf de 1,5 mL sin tapa
13. Centrifugar a máxima velocidad durante 10 segundos a temperatura ambiente. Colocar la columna de extracción en un nuevo tubo eppendorf de 1,5 sin tapa y descartar el tubo anterior en un recipiente de descarte sin Hipoclorito de sodio 10%.
14. Agregar 100 µL de solución de elución (precalentada a 70 °C) a cada columna. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente.
15. Trasvasar el ADN eluido a su correspondiente tubo eppendorf de 1,5 mL con tapa. Descartar la columna y el tubo sin tapa en un recipiente de descarte con Hipoclorito de sodio 10%.

4.6. Condiciones de validez:

Se aceptarán todas las muestras cuyo volumen eluido se aproxime a los 100 µL.

4.7. Cálculo de resultados:

No aplica.

4.8. Interpretación de resultados:

No aplica.

4.9. Expresión de resultado:

No aplica.

4.10. Informe de resultados:

No aplica.

4.11. Conservación de las muestras:

- Almacenar las muestras de GEB a 4 °C.
- Almacenar el ADN extraído a -20 °C.

4.12. Descarte de las muestras:

Descartar el material de desecho en recipientes de descarte con y sin Hipoclorito de sodio 10% según descripción del procedimiento (Ítem 4.5.2).

5. Formularios y registros:

No aplica.

6. Consideraciones especiales:

Realizar la extracción de 11 muestras por vez, como máximo. Incorporar un control negativo (sangre seronegativa + buffer GE). El procedimiento podrá realizarse dos veces por día, una en la mañana y otra en la tarde.

7. Bibliografía:

Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG (2013). Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. PLoS Negl Trop Dis, 7(1): e2000.

8. Anexos:

No aplica.

BIBLIOGRAFÍA

- 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 (2010). Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela. *J Infect Dis*, 201(9): 1308-1315.
- Álvarez MG, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JC, Cura C, Albizu CI, Schijman AG, Abril M, Sosa-Estani S, Viotti R (2015). New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: a pilot short-term follow-up study with adult patients. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(2):833-837.
- Bisio M, Cura C, Duffy T, Altcheh J, Giganti SO, Bergher S, Scapellato P, Burgos JM, Levin MJ, Schreck R, Freilij H, Schijman AG (2009). *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients with HIV coinfection. *Rev Biom*, 20: 166–178.
- Blanco SB, Segura EL, Cura EN, Chuit R, Tulián L, Flores I, Garbarino G, Villalonga JF, Gurtler RE (2000). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop Med Int Health*, 5(4): 293-301.
- Cura CI, Lucero RH, Bisio M, Oshiro E, Formichelli LB, Burgos JM, Lejona S, Brusés BL, Hernández DO, Severini GV, Velazquez E, Duffi T, Anchart E, Lattes R, Altcheh J, Freilij H, Diez M, Nagel C, Vigliano C, Favaloro I, Favaloro RR, Merino DE, Sosa-Estani S, Schijman AG (2012). *Trypanosoma cruzi* discrete typing units in Chagas disease patients from endemic and non-endemic regions of Argentina. *Parasitol*, 139(4): 516-521.
- Cura CI, Duffy T, Lucero RH, Bisio M, Péneau J, Jimenez-Coello M, Calabuig E, Gimenez MJ, Valencia Ayala E, Kjos SA, Santalla J, Mahaney SM, Cayo NM, Nagel C, Barcán L, Málaga Machaca ES, Acosta Viana KY, Brutus L, Ocampo SB, Aznar C, Cuba CA, Gürtler RE, Ramsey JM, Ribeiro I, VandeBerg JL, Yadon ZE, Osuna A, Schijman AG (2015). Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for the Identification of *Trypanosoma cruzi* DTUs in Biological and Clinical Samples. *PloS Negl Trop Dis*, 9(5)
- Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, Favaloro RR, Freilij H, Schijman AG (2009). Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 3(4): e419.
- Duffy T, Cura CI, Ramirez JC, Abate T, Cayo NM, Parrado R, Bello ZD, Velazquez E, Muñoz-Calderon A, Juiz NA, Basile J, Garcia L, Riarte A, Nasser JR, Ocampo SB, Yadon ZE, Torrico F, de Noya BA, Ribeiro I, Schijman AG (2013). Analytical performance of a multiplex Real-Time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(1): e2000.
- Freilij H, Muller L, Gonzalez Cappa SM (1983). Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital Chagas' disease. *J Clin Microbiol*, 18(2): 327-330.
- Freilij H, Altcheh J (1995). Congenital Chagas' disease: diagnostic and clinical aspects. *Clin Infect Dis*, 21(3): 551-555.
- García A, Bahamonde M, Verdugo S, Correa J, Pastene C, Solari A, Tassara R, Lorca M (2001). *Trypanosoma cruzi* transplacental infection: situation in Chile. *Rev Med Chil*, 129(3): 330–332.
- Guías para la atención al paciente infectado con *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación, 2012
- Langton SD, Chevennement R, Nagelkerke N, Lombard B (2002). Analysing collaborative

- trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance. *Int J Food Microbiol*, 79:175–81.
- Lucero RH, Brusés BL, Merino DE, Fernández GJ, Crenna EC, Alonso JM (2007). Enfermedad de Chagas congénito en Hospitales de la ciudad de Corrientes- Argentina. *Enf Emerg*, 9(3): 121-124.
- Lucero, RH, Brusés BL, Cura CI, Formichelli LB, Juiz N, Fernández GJ, Bisio M, Deluca GD, Besuchio S, Hernández DO, Schijman AG (2016). Chagas' disease in Aboriginal and Creole communities from the Gran Chaco Region of Argentina: Seroprevalence and molecular parasitological characterization. *Infect, Genet Evol*, 41: 84-92.
- Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014 May 15;370(20):1899-1908.
- Picollo MI, Vassena C, Santo Orihuela P, Barrios S, Zaidemberg M, Zerba E (2005). High resistance to pyrethroid insecticides associated with ineffective field treatments in *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) from Northern Argentina. *J Med Entomol*, 42(4): 637-642.
- Pifano FC (1954). El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. *Archivos Venezolanos de Patología Tropical*, 2: 89-120.
- Ramírez JC, Cura CI, da Cruz Moreira O, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, Ramírez JD, Alberti A, Pavia P, Flores-Chávez MD, Muñoz-Calderón A, Pérez-Morales D, Santalla J, Marcos da Matta Guedes P, Peneau J, Marcet P, Padilla C, Cruz-Robles D, Valencia E, Crisante GE, Greif G, Zulantay I, Costales JA, Alvarez-Martínez M, Martínez NE, Villarroel R, Villarroel S, Sánchez Z, Bisio M, Parrado R, Maria da Cunha Galvão L, Jácome da Câmara AC, Espinoza B, Alarcón de Noya B, Puerta C, Riarte A, Diosque P, Sosa-Estani S, Guhl F, Ribeiro I, Aznar C, Britto C, Yadón ZE, Schijman AG (2015). Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. *J Mol Diagn*, 17(5):605-615.
- Rodríguez IB, Botero A, Mejía-Jaramillo AM, Márquez EJ, Ortiz S, Solari A, Omar Triana-Chávez O (2009). Transmission Dynamics of *Trypanosoma cruzi* Determined by Low-Stringency Single Primer Polymerase Chain Reaction and Southern Blot Analyses in Four Indigenous Communities of the Sierra Nevada de Santa Marta, Colombia. *Am. J. Trop. Med. Hyg*, 81(3):396–403.
- Rodríguez M, Irazu L, Bueno N, Bonaventura R, Mariotti A, Freire MC (2015). La estimación del límite de detección en la aplicación de los modelos Probit y Pod/Lod. Libro de resúmenes, pág. 83 del XI Congreso Argentino de Virología II Congreso Latinoamericano de Virología IV Simposio de Virología Clínica, II Simposio de Virología Veterinaria. “Dr. José L. la Torre. Buenos Aires, Argentina.
- Rodríguez, D. Balsells y col. 2013. ISSN 1887-6463) Educación continuada en el laboratorio clínico. Comité de educación. M.
- Schijman AG, Altchek J, Burgos JM, Biancardi M, Bisio M, Levin MJ, Freilij H (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J Antimicrob Chemother*, 52(3): 441-449.

-
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, Deborggraeve S, Hajar 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 (2011). International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(1):e931.
- Strout RG (1962). A method for concentrating hemoflagellates. *J Parasit*, 48:100.
- Torrico F, Alonso-Vega C, Suarez E, Rodriguez P, Torrico MC, Dramaix M, Truyens C, Carlier Y (2004). Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg*, 70(2): 201-209.

CITAS DE INTERNET

- http://www.msal.gob.ar/images/stories/boletines/BoletinIntegradoDeVigilanciaVersionVF_SE40.pdf
- <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>
- <http://www.msal.gob.ar/chagas/index.php/informacion-para-ciudadanos/el-chagas-en-el-pais-y-america-latina>
- <http://graphpad.com/quickcalcs.cfm>