

FICHA DE VIGILANCIA DE LABORATORIO

(CIE 10 B 57)

1. AGENTE ETIOLOGICO: *Trypanosoma cruzi*

2. JUSTIFICACION DE LA VIGILANCIA DE LABORATORIO

Agente causal de la enfermedad de Chagas que constituye uno de los principales problemas de salud pública en diversos países del continente americano y sobre todo de Latinoamérica. En el año 1991, los Ministros de Salud de seis países del Cono Sur, incluidos Chile, se comprometieron a realizar acciones para lograr interrumpir la transmisión vectorial y transfusional de la enfermedad de Chagas.

A raíz de este compromiso, el Ministerio de Salud de Chile estableció oficialmente un programa dirigido a alcanzar esta meta. Lo anterior fortalece la importancia de vigilar este agente parasitario.

3. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

Clasificación:

Reino	Protista
Sub Reino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Sub Phylum	Mastigophora
Clase	Zoomastigophorea
Orden	Kinetoplastida
Sub Orden	Trypanosomatina
Familia	Trypanosomatidae
Género	Trypanosoma
Sub género	Schizotrypanum
Especie	cruzi

Variedades: Análisis de isoenzimas y biología molecular, muestran claras evidencias de la existencia de dos subgrupos genéticos designados como: **Linaje 1**,

predominantemente de ciclo doméstico y **Linaje 2** de ciclo selvático, este último se divide en 5 grupos. Ambos linajes son patógenos para el hombre.

Morfología: En sus distintos hospederos y en medios de cultivo *Trypanosoma cruzi* presenta tres tipos morfológicos diferentes

- Tripomastigoto: Fusiforme de aproximadamente 20 a 25 μm de largo, citoplasma granuloso con un núcleo central. Presenta un kinetoplasto subterminal, de éste nace una membrana ondulante que en su borde libre lleva un flagelo. Se encuentra circulando en la sangre de los mamíferos y en extremo posterior del vector (tripomastigoto metacíclico); no se divide.
- Epimastigoto: Fusiforme de unos 20 a 30 μm , con el kinetoplasto ubicado delante del núcleo. Tiene una corta membrana ondulante y un flagelo libre. Es la forma de multiplicación en el intestino del vector y la forma predominante en los medio de cultivo.
- Amastigoto: Elemento redondeado de 2 a 4 μm aproximados, en el que se distinguen el núcleo y el kinetoplasto. Posee un flagelo corto no emergente, el cual no se distingue con microscopía de luz. Esta es la forma de multiplicación intracelular en el mamífero

4. ENFERMEDADES HUMANAS QUE PRODUCE ESTE AGENTE

Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana

5. TIPOS DE MUESTRAS REQUERIDAS

Dependerá de la técnica de laboratorio a realizar:

Diagnóstico Directo: Existen varias técnicas para el diagnóstico directo de este parásito, se mencionarán aquellas de uso más frecuente.

Examen microscópico de sangre fresca: 2 ml de sangre total con anticoagulante.

Gota gruesa: Sangre sin anticoagulante 3 a 4 gotas por preparación. Tomada por punción venosa o digital.

Método MicroStrout: Mediante punción digital recolectando la muestra en 6 capilares heparinizados.

Xenodiagnóstico: El paciente debe someterse a la picadura de triatominos libres de la parasitosis por aproximadamente 20 min. El número de ejemplares y de cajas dependerá del centro que realice el examen.

Diagnóstico Molecular

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Sangre total con anticoagulante cantidad mínima: 1 ml. Se excluye el uso de heparina. También, se puede recolectar sangre total con guanidina (1:4) y sangre en papel filtro.

Diagnóstico Indirecto o Serológico

Suero o plasma

Cantidad: mínimo 2 ml

Nota: No se recomienda el uso de sangre de cordón por la probable interferencia con los métodos diagnósticos

6. PERÍODO ÓPTIMO PARA LA TOMA DE MUESTRA

Debe considerarse el período de la enfermedad del paciente. En aquellos pacientes que se sospeche están en período agudo, deberán realizarse los exámenes directos lo antes posible y para la serología se deberá esperar a lo menos 15 días. Para recién nacidos ambas muestras deben recolectarse simultáneamente.

7. CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Suero o Plasma

Conservada a 4 ° C por un máximo de 5 días

Congelada a -20 ° C

Transporte: En tubo plástico con tapa hermética con la medidas necesarias de bioseguridad y para mantener la temperatura.

Sangre total

Conservada a 4 ° C por un máximo de 3 días

Transporte: En tubo plástico con tapa hermética con la medidas necesarias de bioseguridad y para mantener la temperatura.

8. ALGORITMO DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *T. cruzi*, puede realizarse por:

- Métodos Directos en los cuales se comprueba la presencia del parásito en la muestra.
- Métodos Moleculares en los cuales se comprueba la presencia de material genético del parásito en la muestra.
- Métodos Indirectos que detectan la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en la muestra.

Algoritmo Métodos Directos

En los exámenes en los cuales se compruebe la presencia del parásito podrán ser informados sin necesidad de la confirmación de éste resultado por otro método.

En caso de duda en el diagnóstico directo, la muestra deberá ser enviada al Laboratorio de Referencia de Parasitología del I.S.P.

Algoritmo Métodos Moleculares

En los exámenes en los cuales se compruebe la presencia del parásito mediante la detección de su material genético podrán ser informados sin necesidad de la confirmación de éste resultado por otro método, pero sí requieren las siguientes consideraciones, según el tipo de paciente estudiar:

Menores de 9 meses, requieren de a lo menos **dos resultados positivos** en muestras diferentes para dar el caso como positivo.

Mayores de 9 meses, requieren de **un resultado positivo** y de la detección de anticuerpos confirmada para dar el caso como positivo.

En caso de duda en el diagnóstico, la muestra deberá ser enviada al Laboratorio de Referencia de Parasitología del I.S.P.

Algoritmo Métodos Indirecto

En el caso del diagnóstico indirecto los bancos de sangre o laboratorios clínicos deberán seguir el siguiente algoritmo:

- Se entenderá por examen de tamizaje, a la determinación de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* realizada mediante técnicas de ELISA o aglutinación en los bancos de sangre y laboratorios clínicos del país, tanto públicos como privados.
- Se entenderá como exámenes de confirmación, a la determinación de anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi* realizada mediante técnicas de Inmunofluorescencia indirecta, Western blot y/o PCR realizados por el Laboratorio de Referencia de Parasitología del Instituto de Salud Pública (I.S.P.) o bien por centros autorizados por éste.

El diagnóstico de laboratorio de la infección por *Trypanosoma cruzi* sólo podrá ser informado al paciente después de realizada la confirmación.

Tamizaje (Cuadro N° 1)

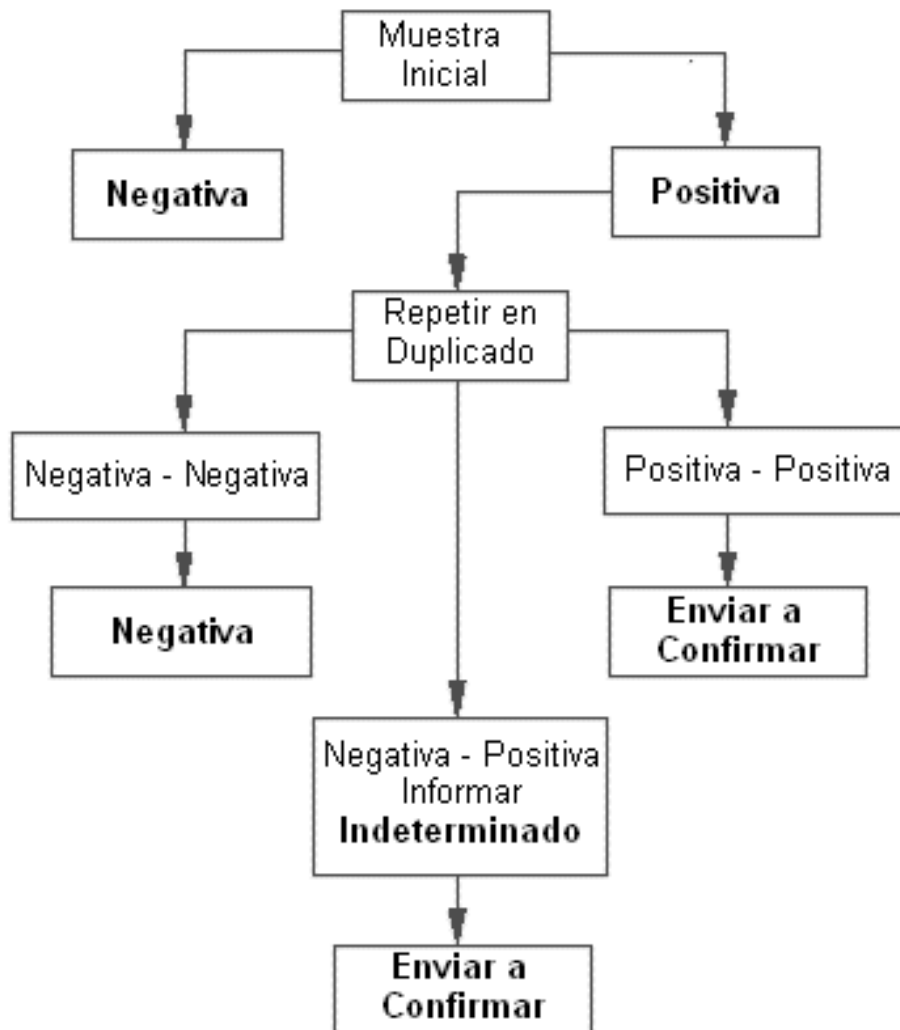
Toda primera muestra que en el tamizaje tenga un resultado positivo para anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* deberá ser sometida nuevamente a una determinación en duplicado, utilizando el mismo test.

En caso de obtenerse un resultado positivo en dos o más de las tres determinaciones, referidas en el punto anterior, la misma muestra deberá ser enviada al I.S.P. o a los centros autorizados por éste para realizar los exámenes confirmatorios.

En caso de obtenerse un resultado negativo en dos de las repeticiones señaladas en el punto n° 1, la muestra deberá ser informada con resultado final negativo.

El examen confirmatorio en el I.S.P. u otro centro autorizado será gratuito. El procedimiento de toma de muestra y envío de la sangre a los centros confirmatorios se realizará de acuerdo a las normas técnicas y administrativas elaboradas por el Laboratorio Nacional de Referencia de Parasitología del I.S.P.

CUADRO N ° 1



9. TÉCNICAS DE LABORATORIO UTILIZADAS

Diagnóstico parasitológico directo: Se describen las técnicas más empleadas para este propósito.

- Observación microscópica al fresco

Consiste en la observación de sangre del paciente, 1 a 2 gotas entre portaobjeto y cubreobjeto. Se busca la presencia de tripomastigotos móviles de *T. cruzi*.

Se deben observar 6 preparaciones por muestra.

Informe de resultados:

Negativo: No se observan tripomastigotos de *T. cruzi*

Positivo: Presencia de tripomastigotos de *T. cruzi*

- Método de concentración MicroStrout

Sangre total tomada directamente del paciente (punción digital) en capilares heparinizados; los que son centrifugados para separar sus componentes. Se examina al microscopio la fracción leucoplaquetaria completa del capilar. Se deben tomar a lo menos 6 capilares por paciente. Se busca la presencia de tripomastigos móviles de *T. cruzi*.

Informe de resultados

Negativo: No se observa tripomastigotos de *T. cruzi*

Positivo: Presencia de tripomastigotos de *T. cruzi*

- Xenodiagnóstico

Basado en la multiplicación activa del *T. cruzi* en el tubo digestivo de triatominos. Se utilizan ejemplares de estados ninfales libres del parásito, sirve para el diagnóstico tanto en la etapa aguda y crónica de la infección con una sensibilidad de 100 % y 50 % respectivamente.

Informe de resultados

Negativo

Positivo

Se emite un informe a los 30, 60 y 90 días.

Diagnóstico Molecular

- Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Técnica de biología molecular que utiliza partidores específicos para amplificar el DNA del parásito en muestras clínicas de pacientes. Es útil para fase aguda, latente y crónica de la enfermedad.

Informe de resultados

Negativo

Positivo

Diagnóstico Parasitológico Indirecto: Se describen las técnicas más empleadas para este propósito

Aglutinación Indirecta

Partículas o glóbulos rojos son sensibilizadas con antígeno soluble de *T. cruzi* los que al entrar en contacto con anticuerpos contra el parásito provocan la aglutinación, lo que se interpreta como una reacción positiva.

Enzima Inmuno Ensayo (ELISA)

Placas de poliestireno son sensibilizadas con antígeno soluble de *T. cruzi*, los que se unirán a anticuerpos específicos contra el parásito si están presentes en la muestra. Se agrega conjugado formado por un anti anticuerpo humano unido a una enzima y se podrá evidenciar una reacción positiva si al adicionar sustrato específico se desarrolla una reacción de color, que indicaría la presencia de anticuerpos en la muestra del paciente.

Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Parásitos completos, obtenidos de cultivo, se fijan a pocillos de placas de vidrio. Suero del paciente en estudio se coloca en contacto con los antígenos, formándose la unión antígeno anticuerpo, luego se agrega un conjugado marcado con sustancias fluorescentes. Al observar las placas en un microscopio de epifluorescencia los parásitos se verán fluorescentes en aquellos casos de muestras con anticuerpos específicos contra *T. cruzi*.

10. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Diagnóstico Directo

Los resultados positivos de cualquiera de las técnicas descritas como métodos parasitológicos directos deberán considerarse como diagnóstico de laboratorio de esta parasitosis.

Los resultados negativos obtenidos con los métodos directos no descartan la presencia del parásito, ya que estos métodos tienen cifras variables de sensibilidad.

Diagnóstico Indirecto

La interpretación de los resultados para los métodos indirectos, se detalla en el punto n° 7 de esta ficha.

11. CONTROL DE CALIDAD INTERNO

Tener implementado un Programa de Control de Calidad en su laboratorio que incluya todas las técnicas para esta parasitosis. Dicho programa debe incorporar el uso de controles (+) y (-) propios y/o comerciales, diseño de cartas-control, registro de novedades relacionadas con las técnicas.

12. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Para las técnicas de diagnóstico indirecto, debe estar adscrito al Programa de Evaluación Externa de la Calidad del Instituto de Salud Pública de Chile en el Subprograma Serología de la Enfermedad de Chagas.

13. CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

El procedimiento de toma de muestra y envío de la sangre o papel filtro a los centros confirmatorios se realizará de acuerdo a las normas técnicas elaboradas por el I.S.P.