

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EVALUACION DE LOS REACTIVOS COMERCIALES PARA
EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
DISPONIBLES EN EL MERCADO DE GUATEMALA**

INFORME DE TESIS

PRESENTADO POR:
LILIAN QUEUSELY CAMEY MIJANGOS

PARA OPTAR AL TITULO DE
QUIMICA BIOLOGA

GUATEMALA, OCTUBRE 2004

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA

**EVALUACION DE LOS REACTIVOS COMERCIALES PARA
EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS
DISPONIBLES EN EL MERCADO DE GUATEMALA**

PRESENTADO POR:
LILIAN QUEUSELY CAMEY MIJANGOS

QUIMICA BIOLOGA

GUATEMALA, OCTUBRE 2004

**JUNTA DIRECTIVA
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**

DECANO	MSC.	GERARDO LEONEL ARROYO CATALAN
SECRETARIO	LICDA.	JEANNETTE SANDOVAL MADRID DE CARDONA
VOCAL I	LICDA.	GLORIA ELIZABETH NAVAS ESCOBEDO
VOCAL II	LIC.	JUAN FRANCISCO PEREZ SABINO
VOCAL III	LICDA.	BEATRIZ EUGENIA BATRES DE JIMENEZ
VOCAL IV	BR.	ROBERTO JOSE GARNICA MARROQUIN
VOCAL V	BR.	ROCRIGO JOSE VARGAS ROSALES

AGRADECIMIENTOS

A MIS ASESORAS Licda. Margarita Paz y Licda. Vivian Matta por
brindarme su confianza y apoyo incondicional.

AL DEPARTAMENTO DE CITOHISTOLOGIA

A LAS DIFERENTES INSTITUCIONES

- Banco de Sangre del Hospital General San Juan de Dios.
- Laboratorio Clínico Santa Elisa
- Centro de referencia de Inmunoanálisis CERIA
- Arquisa
- Comercial Selecta
- DILAB S.A.
- Merck Centroamericana S.A.
- Servimedica
- Distribuidora Almar
- Abbott Laboratorios, S.A.

INDICE

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCION	3
III. ANTECEDENTES	4
A. <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1. Morfología	5
2. Taxonomía	5
3. Ciclo de Vida	6
4. Transmisión	7
B. <i>Enfermedad de Chagas</i>	7
1. Período Agudo	7
2. Período Intermedio	8
3. Período Crónico	8
4. Diagnóstico	9
a. Diagnóstico parasitológico	9
b. Diagnóstico serológico	10
c. Diagnóstico clínico	15
5. Pronóstico	15
6. Tratamiento	15
IV. JUSTIFICACIONES	16
V. OBJETIVOS	17
VI. HIPÓTESIS	18
VII. MATERIALES Y METODOS	19
A. Universo de Trabajo	19
B. Recursos	19
C. Material y Equipo	20
D. Métodos	21
VIII. RESULTADOS	30
IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
X. CONCLUSIONES	36
XI. RECOMENDACIONES	37
XII. REFERENCIAS	38
XII. ANEXOS	42

I. RESUMEN

La enfermedad de Chagas, o Tripanosomiasis Americana, es una enfermedad causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, siendo un insecto vector el responsable de la transmisión del parásito a los animales y al ser humano. Estos insectos depositan sus heces con los microorganismos infectantes sobre la piel del huésped mientras se alimentan, los que entran al organismo a través de la piel erosionada o de la mucosa. En el hombre, la infección puede ser congénita o adquirida y afecta en grado variable a diversos órganos y sistemas, especialmente el corazón y el tubo digestivo.

El diagnóstico de laboratorio depende del estadio en el cual se encuentra la enfermedad. La presencia del *Trypanosoma cruzi* estimula la producción de anticuerpos IgG específicos en el huésped. Durante la fase aguda, el diagnóstico se efectúa directamente mediante la observación de los parásitos en sangre (por microscopía, hemocultivo o xenodiagnóstico) o por métodos inmunológicos que detectan anticuerpos IgM. Durante la fase crónica se detecta la respuesta IgG específica siendo los métodos serológicos más utilizados: la hemaglutinación indirecta, la inmunofluorescencia indirecta y el inmunoensayo enzimático. Estos métodos prácticos hacen posible su empleo como prueba de tamizaje, especialmente en el control de donantes para los bancos de sangre y estudios epidemiológicos.

En Guatemala, se cuenta con varias presentaciones comerciales de ensayos serológicos para el diagnóstico de la enfermedad; sin embargo no hay una garantía de la efectividad de los reactivos ni regulación para su venta. Siendo nuestro país un área endémica de la enfermedad de Chagas se consideró necesario evaluar los diferentes reactivos disponibles en el mercado para un diagnóstico efectivo en nuestra población.

En el presente estudio se evaluó sensibilidad, precisión, exactitud, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de nueve diferentes reactivos que se comercian en Guatemala, los que fueron donados por las diferentes casas comerciales (A – I). Entre los métodos se contó con una prueba rápida de membrana, una de aglutinación con partículas de látex y siete pruebas de inmunoensayo enzimático. Para la evaluación se utilizó un panel de 89 sueros, distribuido en 36 sueros positivos y 53 negativos, dentro de los cuales se incluyó 23 sueros problema.

Los resultados obtenidos en esta evaluación demuestran que las pruebas de membrana y aglutinación con partículas de látex presentan una especificidad y sensibilidad del 90.56% al 92.5% respectivamente. Dos reactivos de la técnica de inmunoensayo enzimático, (**C** e **I**)

presentaron una sensibilidad y valor predictivo positivo del 100% y el reactivo (**D**) de técnica similar, posee una especificidad y un valor predictivo negativo del 100%.

Por los resultados obtenidos, estos tres reactivos de inmunoensayo enzimático son recomendables para el diagnóstico de la enfermedad en la región de Guatemala.

II. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana es una enfermedad parasitaria, causada por *Trypanosoma cruzi*. Este protozoo flagelado se transmite normalmente al humano y otros mamíferos por la picadura de la chinche picuda, conocida así comúnmente y que pertenece a la familia *Reduvidae*, y a los géneros *Triatoma* y *Rhodnius*.

La chinche se alimenta de la sangre por medio de una picadura y la infección es ocasionada por la inoculación pasiva del parásito por medio de las heces, que la chinche deposita en la piel, penetrando al cuerpo a través de la lesión de la picadura o cualquier otra abrasión de la piel o las mucosas.

Se conocen tres etapas de la enfermedad: la fase aguda o corta, en la cual se presenta malestar general, una fase asintomática o indeterminada en la que el paciente no presenta molestias y una fase crónica o terminal en la que hay lesiones importantes como cardiopatía crónica y visceromegalia.

El diagnóstico de las tres fases se realiza con pruebas serológicas que detectan anticuerpos IgG e IgM contra *Trypanosoma cruzi* presentes en el paciente, ya que los métodos para detección del parásito tales como hemocultivo y xenodiagnóstico además de ser invasivos requieren de un largo período para la obtención del resultado. Estos métodos son de gran utilidad para el control de donadores de sangre, donadores de órganos, control de embarazadas y el seguimiento de recién nacidos así como en encuestas seroepidemiológicas.

Guatemala es un país endémico de la enfermedad de Chagas, por lo que es indispensable realizar un diagnóstico adecuado. El propósito del estudio es evaluar los diferentes reactivos que las compañías comerciales tienen disponibles en Guatemala y así recomendar la técnica que más se adecúe a nuestro medio. Para ello se utilizarán sueros de pacientes provenientes de un área endémica, los que ya fueron evaluados en estudios anteriores y por lo tanto se conoce su grado de reactividad con tres metodologías diferentes.

III. ANTECEDENTES

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana, es una afección parasitaria, hemática y tisular que reconoce como agente etiológico el *Trypanosoma cruzi*. Este protozoo flagelado se transmite normalmente al humano y a otros mamíferos, por la picadura de la chinche picuda conocida así comúnmente y que pertenece a la familia *Reduviidae* encontrándose varios géneros, entre ellos *Triatoma* y *Rhodnius*. La enfermedad se extiende actualmente desde el sur de los Estados Unidos, México, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Panamá, Venezuela, Brasil, Argentina, Uruguay y Chile. En cualquiera de éstos países, lo hace en áreas bien delimitadas. Actualmente se calcula que alcanza a unos dieciséis a dieciocho millones de portadores, con repercusión patológica o sin ella y se estima que cien millones de personas se encuentran en peligro de contraerla (1,2).

En 1,909 Carlos Ribeiro Justiniano Das Chagas, trabajando en el estado de Minas-Gerais de Brasil, descubrió la enfermedad que se conoce hoy con su nombre. El bacteriólogo Argentino Salvador Mazza lo conoció poco después, y empezó a investigar la enfermedad, diagnosticando en 1,926 el primer caso agudo en su país (3).

En Guatemala desde el primer reporte de un caso de la enfermedad de Chagas en 1,932 por Reichnow, muchos son los estudios que se han llevado a cabo a fin de determinar su prevalencia y las áreas endémicas de la misma. Los estudios realizados durante 1,935-1,954 por Peñalver, Montenegro, De León y otros, permitieron describir la zona endémica del país, que incluye los departamentos de Chiquimula, El Progreso, Zacapa, Santa Rosa, Jutiapa, Jalapa. Estableciendo además que en dichos departamentos los vectores presentes eran *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* y *Triatoma nitida* (4-,6).

Durante 1,952 – 1,954 el Dr. Aguilar y el intenso trabajo de sus colaboradores permitió la descripción de la enfermedad en zonas rurales del país, lo que contribuyó para que se realizaran las primeras acciones del gobierno con el fin de erradicar la enfermedad (4,6).

De 1,960 a 1,983 es poca la información que se tiene acerca de la investigación y epidemiología de la enfermedad en nuestra población (4,6).

Por el contrario, desde 1,984 hasta nuestros días los registros de las investigaciones realizadas por diferentes instituciones como: el Gobierno de Guatemala con el Gobierno del Japón en estrecha colaboración con la Universidad de San Carlos de Guatemala y la División de Malaria, a través de la firma de un convenio de cooperación, con el apoyo de la Organización Panamericana de la Salud; han permitido determinar la prevalencia de la enfermedad en los diferentes departamentos en donde la enfermedad es endémica. Se

demonstró la trasmisión congénita en el departamento de Chiquimula, así como la trasmisión por medio de los donadores de sangre. Se han hecho estudios de evaluación y estandarización de los métodos diagnósticos para la enfermedad, se ha correlacionado la seropositividad de muestras por medio de métodos inmunoquímicos. Además investigaciones epidemiológicas del vector de la enfermedad, así como sus reservorios, caracterización biológica de las cepas de *Trypanosoma cruzi* entre otras (4,7-11,15-20).

A. *Trypanosoma cruzi*:

1. Morfología: es un hemoprotozoario flagelado de 15 a 20 micras de largo, poco grueso o delgado, con el extremo posterior terminado en punta, que mide el tercio de la longitud total, citoplasma granuloso, núcleo central, cinetoplasto grande (cuerpo parabasal y bleferoblasto) y gránulos de volutina.

En las células tiene la forma redondeada, sin flagelo, de amastigote localizándose de preferencia en el tejido nervioso y músculos, en especial el miocardio. La célula afectada, por la activa reproducción binaria del parásito, adquiere forma quística. Cuando el tripanosoma completa su evolución endocelular, en 4 a 5 días, abandona el endoquiste, parasita otras células vecinas o pasa al torrente para anidarse en tejidos distintos. En el paso de amastigote a tripomastigote se encuentran formas de epimastigote (1,8).

2. Taxonomía: de acuerdo a sus características morfológicas el *Trypanosoma cruzi* recibe la siguiente clasificación taxonómica (1,5,8).

Subreino	<i>Protozoa</i>
Filo	<i>Sarcomastigophora</i>
Subfilo	<i>Mastigophora</i>
Orden	<i>Kinetoplastida</i>
Familia	<i>Trypanosomatidae</i>
Género	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero	<i>Schizotrypanum</i>
Especie	<i>Trypanosoma cruzi</i>

3. Ciclo de vida: Los estadios del parásito que incluye el ciclo de vida rural-urbano de *Trypanosoma cruzi* son:

- Amastigote: Se localiza en los tejidos (miocardio, esófago, colon, neuroglia y sistema retículo endotelial) del huésped vertebrado. Se divide por fisión binaria.
- Epimastigote: se observan en aparato digestivo del vector y en medios de cultivo específicos. Se divide por fisión binaria.
- Tripomastigote: es la forma infectante (metacíclica) y también la forma hemática sanguínea.
- Esferomastigote: Es una forma de transición frecuente entre las fases de amastigote y tripomastigote, particularmente en el intestino del vector (8,9) (Anexo No. 1).

Existe también el ciclo urbano, que incluye exclusivamente al parásito en el hombre. Este ciclo interhumano se desarrolla en el hombre como único reservorio, quién al donar su sangre con serología positiva se encuentre atravesando la etapa crónica de la enfermedad, que pasa por lo común inadvertida. Generalmente los hemodadores son campesinos de bajo nivel socioeconómico, que migran a la ciudad en busca de una mejor forma de vida y se ven obligados a comercializar su sangre. Estos campesinos vienen de áreas endémicas en donde las viviendas son de madera y bajareque, y las condiciones precarias que predominan en el área, se convierten en el hábitat ideal para el desarrollo de los triatóminos (9).

4. Transmisión: La forma más frecuente de contraer la enfermedad es por el contacto con las deyecciones infectantes de las chinches hematófagas pertenecientes a la familia *Reduviidae*, dentro de la cual constituyen una subfamilia especial, *Triatominae*. Se conocen alrededor de cien especies. En Guatemala *Triatoma dimidiata* es de amplia distribución, mientras *Rhodnius prolixus* y *Triatoma nítida* solamente en zonas restringidas (7) (Anexo No. 2).

Otro de los mecanismos de transmisión es el interhumano, y en este sentido se ha demostrado la contaminación perinatal por transmisión del *Trypanosoma cruzi* de la madre al feto, la transmisión por lactancia y a través de la transfusión sanguínea que es mucho más frecuente y grave de lo que se cree, la contaminación de profesionales especialmente cirujanos y obstetras por contacto de la sangre del enfermo con heridas cortadas o de instrumentos punzocortantes, los trasplantes de órganos infectados, la infestación accidental por contacto con material contaminante, accidentes de laboratorio relacionados con la manipulación de sangre de animales experimentales infectados y el descuido en el manejo de cultivos del parásito. Además se estudia la posibilidad de transmisión a través de la relación sexual, teniendo en cuenta la capacidad del parásito de atravesar cualquier mucosa y el hecho de que se ha demostrado su presencia en el aparato genital femenino. (1,5,8,11).

B. Enfermedad de Chagas:

Su evolución se caracteriza por presentar tres períodos:

1. El período agudo o de inicio:

Dura alrededor de 4 a 10 días. La mayor parte de los afectados por la enfermedad son niños, no porque estos sean más susceptibles que los adultos, sino simplemente por estar más expuestos a la picadura de la chinche (9,10).

El comienzo de las molestias es súbito, presentando el enfermo fiebre que oscila entre 38 a 39.5°C con un perfil intermitente e irregular generalmente con picos vespertinos; a veces puede ser continua y elevada, relacionándose su intensidad con la gravedad de la infección. Generalmente se acompaña de escalofríos, dolor de cabeza y de músculos, malestar general e inapetencia. Muchas veces hay signos en el organismo que delatan la puerta de entrada de la infección siendo ellos: el complejo oftalmoganglionar y el chagoma (1).

El complejo oftalmoganglionar o signo de Romaña, se caracteriza por: comienzo habitualmente súbito, hinchazón elástica e indolora de los párpados superior e inferior de un solo ojo, que toma color morado, conjuntivas rojas hinchazón moderada del lado facial correspondiente al ojo afectado. Esta afección es de gran valor diagnóstico y desaparece lentamente en el curso de la fase aguda (9).

El chagoma consiste en zonas de endurecimiento cutáneo que pueden aparecer en cualquier lugar del cuerpo. Estas zonas tienen un color rojo y alta temperatura local. Son poco dolorosos y tienden a desaparecer luego de 2 a 3 meses.

El agrandamiento de ganglios indoloros suele aparecer en cuello, axila, hígado y bazo. El corazón suele presentar alteraciones leves como insuficiencia cardíaca o evolucionar a insuficiencia cardíaca congestiva, a veces de instalación brusca y curso violento, que conduce a la muerte en cuestión de horas o días (10).

La hepatoesplenomegalia se presenta en 30 a 40% de los casos. El hígado suele aumentar rápida e intensamente de volumen al instalarse la insuficiencia cardíaca aguda. La meningoencefalitis es rara y de pronóstico reservado. Se presenta principalmente en lactantes y en estos casos son comunes los movimientos convulsivos generalizados con crisis frecuentes o espaciadas (1,9,10) (Anexo No. 3).

2. El período intermedio o de latencia:

Denominado forma subclínica o infección chagásica; cuya duración es variable y puede alcanzar varios años. No hay ningún síntoma y la enfermedad se pone en evidencia por medio de la seropositividad asintomática de un individuo. La mayor parte de las personas permanecen en este período el resto de sus vidas, y hay quienes se curan espontáneamente (9,10) (Anexo No. 4).

3. El período crónico:

Es una manifestación tardía de la infección. Se encuentra en un 15% de quienes han padecido el contagio, caracterizándose por presentar alteraciones del corazón y/o alteraciones del tracto gastroduodenal. La pared ventricular presenta adelgazamiento y fibrosis, que son más intensas en el ápice, donde apenas se aprecian las fibras musculares. La persistencia de las lesiones miocárdicas conduce a la insuficiencia ventricular, dilatación cardíaca, reducción del volumen sistólico y alteraciones de la conducción característicos en este período. Los síntomas más comunes son: palpitaciones, disnea, dolores referidos en el área cardíaca, dolor en la zona hepática y manifestaciones típicas que se observan en el electrocardiograma. La cardiopatía chagásica se produce en personas que son jóvenes, es decir que tienen un organismo relativamente sano (1,10,12).

El megacolon y megaesófago son producto de la disfunción motora de los segmentos del colon y esófago debido a la denervación parasimpática (9) (Anexo No.5).

4. Diagnóstico:

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas se realiza teniendo en cuenta los datos clínicos, la procedencia del enfermo y la historia de su contacto con las chinches, así como los estudios de gabinete y de laboratorio (1,9).

a. Diagnóstico parasitológico:

Está basado en la detección del tripomastigote del *Trypanosoma cruzi* por análisis microscópico de muestras sanguíneas. Generalmente se realiza durante el período agudo de la enfermedad, ya que se requiere una alta parasitemia para detectar al parásito (13).

i. Métodos directos:

- Frote sanguíneo: este puede ser coloreado con Giemsa y observar el parásito que aparece en forma de U, S o media luna; u observación microscópica del parásito en sangre fresca colocada entre el porta y cubreobjetos, en donde se observa fácilmente el movimiento del protozoo (5,8).
- Concentración de parásitos o la técnica de Strout: consiste en recolectar sangre en tubo capilar y centrifugarlo para luego examinar al microscopio la interfase entre la capa de células rojas y glóbulos blancos para observar la presencia del parásito moviéndose en la misma. También puede optarse por centrifugar el capilar y luego cortarlo en la interfase para observar una gota de ésta al microscopio (18).
- El método de Hoff es recomendado, este utiliza Cloruro de Amonio (0.87 P/V) para lizar eritrocitos de sangre completa anticoagulada con EDTA y así facilitar la observación del parásito (6,18).

ii. Métodos indirectos:

- Xenodiagnóstico: consiste en demostrar el parásito en las heces de triatomas de laboratorio que 30 días antes han picado al individuo sospechoso. Es un método sensible y de fácil interpretación aunque es invasivo y se corre riesgo de infección por parte de los manipuladores (1,15).
- Hemocultivo: se realiza inoculando sangre en medios como LIT (triptosa de infusión de hígado) y BHI (infusión de cerebro corazón). El método es útil para el aislamiento

del parásito en los períodos agudo y crónico, y es el método de referencia para el diagnóstico (5,8).

b. Diagnóstico serológico:

Se basa en la detección de anticuerpos circulantes de tipo IgM al principio de la infección (período agudo) y anticuerpos IgG conforme la enfermedad progresa (período intermedio y crónico). Siendo uno de los principales soportes para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (15).

i. Técnicas para la detección de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi*:

- Fijación de Complemento (FC o reacción de Machado Guerreiro): Este término es aplicado a una serie de ensayos en los cuales el complemento es activado o fijado por un sistema de reacción. Está técnica pone en evidencia la reacción antígeno-anticuerpo, se desarrolla al añadir un antígeno conocido, el cual puede ser de las etapas de amastigote, tripomastigote y epimastigote del *Trypanosoma cruzi*; en contra de un anticuerpo desconocido del suero de un paciente. La muestra del paciente se incuba con los eritrocitos cubiertos de antígeno del parásito. Si la hemólisis no ocurre el anticuerpo desconocido está presente en la muestra. La técnica de FC posee alta sensibilidad tanto en la fase aguda como en la fase crónica. En la enfermedad de Chagas esta reacción se positiviza de 6 a 8 semanas después del inicio de los síntomas (19,21-25).
- Reacciones de Aglutinación Pasiva: Es una reacción serológica clásica que comprende la aglomeración de una suspensión de partículas sobre las que se encuentra el antígeno, por medio de un anticuerpo específico. Este tipo de reacción tiene un principio semejante a la precipitación, excepto por el tamaño físico de las partículas (látex, partículas de gelatina) es enorme, en comparación con el de las moléculas de antígeno soluble que utiliza en precipitación. La reacción se desarrolla cuando los antígenos superficiales o aglutinógenos que originan la reacción de aglutinación, entran en contacto con los anticuerpos o aglutininas presentes en el suero (22,23).

Las variaciones en la capacidad de distintos anticuerpos para causar aglutinación, dependen del carácter y el número de sitios utilizables para la combinación en cada miembro que participa en la reacción. Los anticuerpos IgM aglutinan más intensamente que los de tipo IgG. El pH, temperatura, movimiento y presencia de electrolitos en el medio son algunos de los factores que afectan la reacción (25).

Esta reacción de aglutinación para diagnóstico de la enfermedad de Chagas se fundamenta en el uso de partículas de látex sensibilizadas con antígenos citoplásmicos y de membrana de *Trypanosoma cruzi*, en presencia de un líquido de contraste. Si la muestra contiene anticuerpos anti *Trypanosoma cruzi*, éstos reaccionarán de forma sensible y específica, produciéndose una aglutinación visible macroscópica. Esta técnica es procedimiento rápido de tamizaje para la detección de anticuerpos, tanto IgM como IgG (24-26).

- Hemaglutinación Indirecta o Pasiva (IHA/HAP): La hemaglutinación es una aglutinación de eritrocitos recubiertos por antígenos; es un método sensible y específico para la identificación de pequeñas cantidades de antígenos solubles en la sangre y otros líquidos del cuerpo.

La Hemaglutinación Indirecta emplea el eritrocito como portador pasivo o inerte del antígeno. Se lleva a cabo cubriendo artificialmente a los eritrocitos con una capa de antígeno del parásito de *Trypanosoma cruzi* y luego aglutinándolos con anticuerpos específicos presentes en el paciente infectado. Varios estudios han demostrado que en la enfermedad de Chagas. El punto de corte en la hemaglutinación pasiva da positividad a una dilución de 1/32 (15,25).

- Inmunoensayo enzimático (ELISA):

Durante la década de los sesenta, se investigó ampliamente un gran número de reactivos que podrían ser de utilidad como trazadores o marcadores para la detección de antígenos, anticuerpos y otros componentes séricos, basándose únicamente en la reacción primaria Ag-Ac, lo que llevó al desarrollo de las técnicas llamadas de captador y ligando como, la inmunofluorometría, el radioinmunoensayo y ensayos inmunoenzimáticos (21).

Los ensayos inmunoenzimáticos se basan en dos fenómenos importantes; primero, en el extraordinario poder discriminatorio de los anticuerpos que reside en su especificidad y afinidad hacia los antígenos o haptenos y segundo, el alto poder catalítico y

especificidad de las enzimas lo que las hace fácilmente detectables. Por lo tanto, el principio, de los ensayos inmunoenzimáticos descansa en dos pasos fundamentales, la reacción entre los inmunoreactantes (anticuerpo con su correspondiente antígeno) y su detección utilizando enzimas como indicadoras que se unen a dichos reactantes. Posteriormente el inmunocomplejo unido a la enzima trazadora se pone de manifiesto por reacción con el sustrato sobre el que esta última actúa de manera específica, produciendo un compuesto coloreado que es medido espectrofotométricamente (23,26). Este principio es modificado según el tipo de ensayo que se trate y así podrá realizarse la detección cualitativa o cuantitativa de antígenos o anticuerpos. Estos ensayos pueden basarse en la amplificación o en la modulación de la actividad enzimática. Existen muchas variantes de los ensayos inmunoenzimáticos, que de manera general se clasifican en base a la separación física del antígeno ligado y el no ligado; los métodos que requieren dicha separación se denominan heterogéneos y los que no la requieren, homogéneos (22,25).

Dentro de los métodos heterogéneos esta el método competitivo en fase sólida, en el cual los antígenos o anticuerpos se adsorben al inmunoreactante específico. Estos ensayos recibieron el nombre de ELISA de las siglas en inglés Enzyme Linked Immunosorbent Assay. En los métodos competitivos el anticuerpo se encuentra adherido a un tubo, pozo o perlas de poliestireno (fase sólida), a este sistema se le denomina inmunoabsorbente; se agrega la muestra que contiene cantidades desconocidas del antígeno a detectar junto con una cantidad conocida de antígeno conjugado con enzima, ambos antígenos compiten por los sitios de unión de los anticuerpos, luego de un período de incubación se lavan los tubos, pozos o esferas. El conjugado no unido se elimina en el lavado. Los tubos, pozos o esferas se incuban con la solución de sustrato específico para la enzima, cuya reacción es detenida y medida espectrofotométricamente (26).

Para el conjugado pueden utilizarse gran variedad de enzimas, éstas deben ser estables, altamente reactivas, disponibles en forma pura que produzcan conjugados estables y que sean baratos. Peroxidasa de rábano y fosfatasa alcalina son los más utilizados por su bajo costo y fácil conjugación (21,22).

El sustrato debe ser barato, seguro y dar productos completamente solubles con coeficientes de extinción alto (color denso por unidad degradada). Para algunos propósitos se puede preferir un sustrato fluorogénico. Un sustrato muy conveniente es

el p-nitrofenilfosfato, otro es o-fenilendiamina. La reacción puede ser detenida con NaOH o H₂SO₄ y el producto amarillo es bastante estable (23,26).

Básicamente un ELISA se caracteriza por su fácil ejecución, alto grado de reproducibilidad, extrema sensibilidad, se adapta a la automatización y es de bajo costo. Actualmente debido a los avances de la tecnología las compañías comerciales tienen a la disposición distintas presentaciones de los ensayos inmunoenzimáticos, para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Están los que ponen en evidencia la presencia o ausencia de anticuerpos IgG, las compañías que fundamentan su método en el uso de un adhesivo biológico para la activación de las placas, lo que facilita la inmovilización del antígeno ofreciendo así una alta sensibilidad y lo denominan un ensayo de segunda generación; y otras que utilizan un antígeno recombinante a partir de proteínas específicas de los estadios de epimastigote y tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*, ofreciendo obtener resultados reproducibles, específicos y con una elevada sensibilidad (26-28,29-34).

v. Inmunofluorescencia indirecta (IFI):

Las técnicas de anticuerpos fluorescentes o de inmunofluorescencia son básicamente histoquímicas o citoquímicas, utilizándose tanto para la detección de antígenos como de anticuerpos. Un anticuerpo específico se conjuga con un compuesto químico fluorescente (fluorocromo), lo que resulta en un marcador sensible con su reactividad inmunológica inalterada. El antisuero conjugado se adhiere a las células o tejidos fijándose a los antígenos, formando un complejo inmune estable. Las proteínas que no son inmunoglobulinas se deben remover por lavados con solución amortiguadora de fosfatos y la reacción Ag-Ac se observa en un microscopio de luz ultravioleta (21,22).

El método indirecto o inmunofluorescencia indirecta, también llamado método de antiglobulina, permite la identificación de anticuerpos en sueros o fluidos no marcados. Es una adaptación de la reacción de antiglobulina o de la técnica de doble anticuerpo. El anticuerpo no conjugado es expuesto al antígeno epimastigote o tripomastigote de *Trypanosoma cruzi*, luego de su unión se lava y la reacción se pone de manifiesto con un segundo anticuerpo conjugado (antiglobulina). Un aspecto importante de esta técnica es que puede utilizarse un conjugado polivalente o bien monovalente, en relación a las clases de inmunoglobulinas que se desean detectar, es decir que un conjugado polivalente detecta cualquier clase de anticuerpo, mientras que uno monovalente es específico contra una clase de inmunoglobulina solamente (IgG, IgM, IgA) (25).

Es el método más ampliamente usado en el laboratorio de inmunología debido a su alta sensibilidad. La literatura refiere que IFI se positiviza de 2 a 3 semanas aproximadamente después de iniciar la infección chagásica, detectando anticuerpos IgM (15,23).

vi. Inmunocromatografía:

Se fundamenta en la detección cualitativa de los anticuerpos. El método emplea una combinación de un anticuerpo específico adherido a una proteína, la cual se conjuga en partículas muertas y los antígenos están adheridos a la fase sólida que es la membrana. La muestra se añade en la superficie adsorbente. Mientras la muestra traspasa el área del conjugado, la mezcla traspasa la fase sólida hasta llegar a los antígenos. Si los anticuerpos frente a *Trypanosoma cruzi* están presentes en la muestra, se adhieren a los antígenos de la fase sólida, produciendo una banda en la ventana de los resultados del paciente. Si los anticuerpos no están presentes en la muestra traspasa la ventana de resultados del paciente y no se forma la banda. Para asegurar la validez de los resultados, el ensayo incluye un control en el procedimiento (25,29).

b. Detección de Antígenos de *Trypanosoma cruzi*:

- i. PCR (reacción de polimerasa en cadena): ha demostrado que puede detectar hasta 1 parásito por 10 ml de sangre (23).
- ii. Electroforesis: es altamente específico debido a la constitución molecular del *Trypanosoma cruzi* (5,18).
- iii. Western Blot: empleado para el estudio de antígenos purificados, con el propósito de implementar pruebas serológicas altamente sensibles y específicas (25).

c. Diagnóstico clínico:

- i. Electrocardiograma: demuestra bloqueo de rama derecha y hemibloqueo anterior izquierdo, que dada la baja incidencia de patología diferencial lo convierte en un estudio de alta especificidad en nuestro medio (1,10).
- ii. Radiología baritada: puede demostrar la presencia de un megaesófago o un megacolon al observar la dilatación del bario en las respectivas vísceras (9).

En el caso de miocardiopatía la radiología revela una sombra megacardiaca que es muy específica (1,8).

iii. Radiografía de tórax: muestra cardiomegalia debido a la masiva proliferación del parásito (10).

5. Pronóstico:

En la fase aguda el pronóstico depende de la edad, el estado de nutrición, el tipo y la intensidad de manifestaciones presentadas por el paciente.

Casi siempre la enfermedad tiene carácter más grave en los lactantes sobre todo en los de corta edad, a los que puede ocasionar la muerte.

En la cardiopatía chagásica crónica el pronóstico es variable y depende principalmente, del grado de aumento de corazón, el tipo de trastorno del ritmo cardíaco, del grado de insuficiencia cardíaca y de la tendencia evolutiva de la infección. La muerte puede sobrevenir súbitamente o bien luego del padecimiento imputable a falla del corazón (1,11).

6. Tratamiento:

Los medicamentos disponibles en el mercado son:

a. Lampit (nitrofurazona): Las dosis prescritas son: en niños: 15-20 mg/kg/día y en adultos: 5 mg/kg peso/día iniciales incrementando lentamente hasta alcanzar una dosis de 10 mg/kg peso/día

b. Radanil (benzimidazol): 5 mg/kg peso/día por 30 días.

Entre las primeras semanas los efectos secundarios de ambas sustancias suele ser: anorexia, intolerancia digestiva, exantema (lo que puede llegar a ser del tipo de la dermatitis exfoliativa) y fotodermatitis. En casos de déficit enzimático de glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, ambos medicamentos podrían inducir anemia hemolítica. Al final del tratamiento puede aparecer afección del sistema nervioso central, insomnio, alucinaciones y psicosis (10).

IV. JUSTIFICACIONES

La detección de anticuerpos séricos para los componentes de *Trypanosoma cruzi* es el principal soporte para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, ya que los métodos parasitológicos requieren de 20 a 60 días, frecuentemente carecen de sensibilidad, son laboriosos y son un procedimiento doloroso y traumático para el paciente.

En nuestro país el Ministerio de Salud Pública a través del Laboratorio Unificado de Control de Alimentos y Medicamentos (LUCAM) regula el registro y comercialización de los reactivos de diagnóstico. Sin embargo sólo se exige el registro sanitario, sin ninguna evaluación que garantice la efectividad de los productos en nuestro medio antes de su comercialización.

Siendo Guatemala un área endémica de la enfermedad de Chagas y tomando en cuenta que la transfusión sanguínea es una de las vías de transmisión más frecuente, el diagnóstico serológico permite realizar el tamizaje en el control de donadores para el banco de sangre así como estudios epidemiológicos.

Por ello, es necesario realizar una evaluación de los reactivos comerciales para recomendar el más efectivo disponible en el mercado, que permita un diagnóstico confiable en nuestra población.

V. OBJETIVOS

A. Objetivo general

1. Evaluar los reactivos disponibles en el mercado para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la población guatemalteca.

B. Objetivos específicos

1. Determinar especificidad, sensibilidad, exactitud, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo de los reactivos en estudio.

2. Recomendar la técnica más confiable para el diagnóstico de la enfermedad.

VI. HIPÓTESIS

Al menos dos de los reactivos evaluados en el estudio, son útiles para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas en la población guatemalteca.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Universo de trabajo:

En el estudio se incluyeron nueve juegos de reactivos donados por diferentes compañías comerciales: CHAGAS STAT-PAK (Chembio Diagnostic Systemms), ABBOTT CHAGAS ANTICUERPOS EIA (Abbott Laboratorios de Brasil), TEST ELISA PARA CHAGAS (BIOS Chile, Ingeniería Genética S.A.), CHAGATEST ELISA; CHAGATEST ELISA recombinante v.3.0; CHAGATEST LÁTEX (Wiener lab.), CHAGAS' IgG ELISA (Meridiam), CHAGASCREEN ELISA (Sanofi Diagnostics Pasteur), PATHOZYME CHAGAS (Omega Diagnostics Limited).

B. Recursos:

1. Recursos humanos:

- a. Estudiante de Química Biológica: Lilian Queusely Camey Mijangos
- b. Asesoras: Licda. Vivian Matta de García y Licda. Ana Margarita Paz de Ramírez

2. Recursos Institucionales:

- a. Departamento de Citohistología de la Escuela de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, USAC.
- b. Banco de Sangre del Hospital General "San Juan de Dios".
- c. Laboratorio Clínico Santa Elisa.
- d. Centro de Referencia de Inmunoanálisis (CERIA).
- e. Arquisa
- f. Comercial Selecta
- g. DILAB S.A.
- h. Merck Centroamericana S.A.
- i. Servimedica
- j. Distribuidora Almar
- k. Abbott Laboratorios, S.A.

C. Material y Equipo

1. Material:

- a. Pipeta automática graduable de 5-50 ul
- b. Pipeta automática graduable de 100-500 ul
- c. Pipeta multicanal automática graduable 50-100 ul
- d. Placas de fondo oscuro
- e. Contenedores de reactivos para pipeta multicanal
- f. Recipiente para descartar
- h. Puntas para pipeta de 0-200 ul
- i. Puntas para pipeta de 500-1000 ul
- j. Pinzas no metálicas
- k. Dispensador de esferas
- l. Gradillas para tubos de ensayo
- m. Tubos de ensayo
- n. Cubierta adhesiva de placas
- o. Guantes descartables
- p. Bata de manga larga
- q. Hojas de trabajo

2. Equipo:

- a. Refrigerador de 2 a 8 °C
- b. Incubadora de 37 °C
- c. Agitador por rotación
- d. Lector de ELISA
- e. Lavador automático
- f. Incubador COMMANDER PPC
- g. Lector COMMANDER
- h. Quick Wash (lavador de esferas)

3. Reactivos:

- a. Set de reactivos CHAGAS STAT-PAK: (Chembio Diagnostic Systems)
- b. Set de reactivos CHAGASCREEN ELISA: (Sanofi Diagnostics Pasteur)
- c. Set de reactivos CHAGATEST ELISA: (Wiener lab.)
- d. Set de reactivos CHAGATEST LATEX: (Wiener lab.)
- e. Set de reactivos CHAGATEST ELISA recombinante v.3.0: (Wiener lab.)
- f. Set de reactivos CHAGAS' IgG ELISA: (Meridiam)
- g. Set de reactivos ABBOTT CHAGAS ANTICUERPOS EIA: (Abbott Laboratorios Brasil)
- h. Set de reactivos PATHOZYME CHAGAS: (Omega Diagnostics Limited.)
- i. Set de reactivos TEST ELISA PARA CHAGAS: (BIOS Chile, Ingeniería Genética S.A.)

D. Métodos:

- 1. Set de reactivos CHAGAS STAT PAK:
 - a. Se removió el número necesario de placas del envoltorio y se colocó sobre superficie plana.
 - b. Se identificó la unidad de test con el número o nombre del paciente.
 - c. Se agregó 5 *ul* de suero al pozo correspondiente
 - d. Utilizando el gotero se agregó lentamente 6 gotas (240 *ul*'s) del diluyente provisto, en el pozo de la muestra.

- e. Se leyeron los resultados al transcurrir 15 minutos, las muestras con resultado positivo presentaron una doble banda púrpura, las negativas solamente la banda en el área de control de la membrana y las dudosas con una banda débilmente coloreada en el área de muestra y una bien coloreada en el área del control de la membrana.

2. Set de reactivos CHAGASCREEN ELISA:

- a. Los reactivos y las muestras se estabilizaron a temperatura ambiente antes de iniciar la prueba. Se realizó la dilución de la muestra y/o controles (dos controles positivos y tres negativos) con el diluyente de muestras, asegurándose de colocar los mismos en el seno del líquido y no sobre las paredes o el fondo del pozo. Se enjuagó la pipeta con el diluyente depositado en el pozo para asegurar una correcta homogenización, de acuerdo a la siguiente tabla.

	Desconocida	Control Positivo	Control Negativo
Diluyente de muestra:	200 <i>ul</i>	200 <i>ul</i>	200 <i>ul</i>
Control Positivo		10 <i>ul</i>	
Control Negativo			10 <i>ul</i>
Muestra	10 <i>ul</i>		

Una vez cargadas las muestras en cada tira se mezcló suavemente los laterales de la microplaca durante 10 segundos.

Para evitar la evaporación, se cubrió la placa con un papel autoadhesivo e incubó por 30 minutos a 37°C.

- b. Se aspiró cuidadosamente el líquido de cada pozo colocándolo en un recipiente para desechos biológicos que contenía 5% de hipoclorito de sodio. A continuación, se lavó 5 veces con buffer de lavado empleando cada vez aproximadamente 300 *ul*/pozo. El líquido después de cada lavado, se descartó también en el recipiente con hipoclorito. Al finalizar el último lavado, se eliminó por completo el líquido residual, invirtiendo la microplaca y golpeándola varias veces sobre papel absorbente,

ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras pozos.

- c. Se agregó 60 *ul* de conjugado a cada pozo. Se mezcló e incubó como en el paso (a). Posteriormente se lavó como en el paso (b).
- d. Se agregó a cada pozo: 50 *ul* de substrato A y 50 *ul* de substrato B. Se mezcló como en el paso (a), e incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- e. Luego se agregó 50 *ul* gota de solución de parada a cada pozo. Se mezcló aplicando suaves golpes durante 10 segundos.

Se leyó en espectrofotómetro a 450 nm, se calculó el punto de corte (promedio de los tres controles negativos + 0.200). Un resultado positivo se obtiene usando la muestra con una absorbancia mayor de este valor, y un resultado negativo usando las muestras con un valor menor al punto de corte.

3. Set de reactivos CHAGATEST ELISA / CHAGATEST ELISA recombinante v.3.0:

Se llevó a temperatura ambiente los reactivos y las muestras antes de iniciar la prueba. Una vez iniciado el procedimiento se completó sin interrupción. Se procesó simultáneamente 2 controles positivos (CP), 3 negativos (CN) y los desconocidos (D). Se depositó la muestra y/o controles sobre el diluyente de muestras, asegurándose de colocar los mismos en el seno del líquido y no sobre las paredes o el fondo del pozo. Se enjuagó la pipeta con el diluyente dispensado en el pozo asegurando una correcta homogenización.

- a. Se agregó a cada pozo de la microplaca 200 *ul* del diluyente de muestras y 10 *ul* de: 3 controles negativos, 2 controles positivo y las muestras desconocidas. Se cubrió la placa con cinta adhesiva y se mezcló aplicando golpes suaves en los laterales de la microplaca durante 10 segundos.

- b. Se incubó a 37°C durante 30 minutos. Se aspiró cuidadosamente el líquido de cada pozo recibiendo en un recipiente de desechos biológicos que contenía 5% de hipoclorito sódico.
- c. Se lavó 5 veces con buffer de lavado empleando cada vez aproximadamente 300 ul/pozo. Al finalizar el último lavado, se eliminó por completo el líquido residual, invirtiendo la microplaca y golpeándola varias veces sobre papel absorbente, ejerciendo una leve presión con la mano sobre los laterales mayores del soporte, para evitar la caída de las tiras de pozo.
- d. Se agregó en cada pozo 50 ul de conjugado.
- e. Se incubó a 37°C durante 30 minutos.
- f. Se lavó como se indica en el paso 3.
- g. Se agregó sustrato, 50 ul del A + 50 ul del B, se mezcló e incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
- h. Se dispensó 50 ul de solución de parada.
- i. Se hizo la lectura en espectrofotómetro a 450 nm. El valor de corte se calculó a partir del promedio de los tres controles negativos sumando 0.300. Todas las muestras debajo de este valor se tomaron negativas. La zona de indeterminada se calcula a partir del valor de corte +/- 10%.

Se consideró muestras no reactivas a las que presentaron absorbancias menores a las del límite inferior de la zona indeterminada. Las muestras reactivas presentaron absorbancias mayores al límite superior de la zona de indeterminación y las que presentaron valores en el intervalo de zona indeterminada se analizaron nuevamente.

4. Set de reactivos CHAGATEST LÁTEX:

Se llevó los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. El antígeno látex se agitó antes de usar. En uno de los sectores delimitados de la placa de vidrio se colocó:

Muestra	1 gota (50 ul)
Contraste	1 gota (50 ul)
Antígeno-Látex	1 gota (50 ul)

Usando un palillo descartable, se mezcló durante 4-5 segundos la mezcla hasta obtener una suspensión uniforme en toda la superficie del sector.

Se colocó la placa en un agitador de rotación horizontal, agitándose la placa durante 5 minutos y luego se observó macroscópicamente los resultados, manteniendo la placa bien iluminada.

Al no disponerse de un agitador mecánico, la agitación puede realizarse de forma manual, balanceando la placa continuamente durante 7 minutos. En las muestras positivas se observó aglutinación en la placa de fondo oscuro; y en las muestras negativas no hubo aglutinación.

5. Set de reactivos CHAGAS' IgG ELISA:

- a. Las muestra y los controles se diluyeron 1:21 con el diluyente IgG de muestras.
- b. Se dispensó 100 *ul* del suero diluido en cada pozo de la microplaca.
- c. Se cubrió la microplaca con el autoadhesivo e incubó durante 30 +/- 2 minutos a 37 °C.
- d. Se lavaron los pozos con la solución de lavado. Se utilizó de 250 a 300 *ul* de la solución de lavado, luego se aspiró y repitió procedimiento.
- e. Se agregó 100 *ul* del conjugado a cada pozo.
- f. Se repitió paso c.
- g. Se repitió paso d.
- h. Se agregó 100 *ul* de solución de sustrato a cada pozo.
- i. Se repitió paso c.
- j. Se agregó 100 *ul* de la solución de parada a cada pozo.
- k. Se hizo la lectura a 405 nm .

La absorbancia del control positivo debe de ser mayor de 0.500, la del control negativo menor de 0.250. El promedio de tres controles negativos es el valor de corte. Si de alguna de estas tres muestras no se obtuvo el valor correspondiente, no hay valor de corte para determinar el resultado de las muestras.

6. Set de reactivos ABBOTT CHAGAS ANTICUERPOS EIA:

Se utilizaron tres controles negativos, tres controles positivos y las muestras.

Antes de comenzar el procedimiento de ensayo, se llevó todos los reactivos a temperatura ambiente y mezcló suavemente. Se ajustó el Incubador Dinámico COMMANDER, el baño María o equivalente a una temperatura entre 38 y 42 °C. Identificando los pocillos de la placa de reacción para cada muestra o control.

a. Dilución de muestras:

- i. Se pipeteó 10 *ul* de cada control y muestra en el fondo de un tubo de ensayo.
- ii. Se dispensó 400 *ul* de diluyente de muestra en cada tubo de ensayo.
- iii. Se aseguró una mezcla adecuada, agitando ligeramente las placas.
- iv. Se transfirieron 200 *ul* de cada muestra o control diluido al pocillo correspondiente de la placa de reacción.

b. Primera incubación:

- i. Se añadió una esfera a cada pocillo que contenía un control o una muestra diluida.
- ii. Se cubrió con una hoja adhesiva, agitando la placa ligeramente para cubrir las esferas y así eliminar las burbujas de aire que hayan quedado atrapadas.
- iii. Se Incubó a una temperatura entre 38 y 42 °C durante 55 a 65 minutos.
- iv. Se retiró y desechó la hoja adhesiva.
- v. Se lavó cinco veces con el lavador automático de esferas.

c. Segunda incubación:

- i. Se añadió 200 *ul* de conjugado diluido a cada pocillo de reacción.
- ii. Se aplicó una nueva hoja adhesiva; agitando la placa ligeramente.
- iii. Se incubó a temperatura entre 38 a 42 °C durante 28 a 32 minutos.
- iv. Se retiró y desechó la hoja adhesiva.
- v. Se lavó cada esfera igual que el inciso 4.6.2

d. Desarrollo del color:

- i. Se transfirieron las esferas inmediatamente a los tubos de ensayo.
- ii. Se purgó el dispensador inmediatamente antes de dispensar la solución de sustrato OPD.
- iii. Se aspiró 300 μ l de solución de sustrato de OPD recién preparada en dos tubos vacíos (blancos de sustrato) y después en cada tubo que contenía una esfera.
- iv. Se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 28 a 32 minutos.
- v. Se añadió 1 ml de ácido sulfúrico 1 N a cada tubo y agitó para mezclar.

e. Lectura:

- i. En modo 0, se blanqueó el instrumento con el tubo de agua.
- ii. Se determinó la absorbancia del blanco de sustrato. Para que sea válido, el valor del blanco de sustrato que debe ser igual o superior a 0.020 e igual e inferior a 0.040. Se detuvo el ensayo del Modo 0.
- iii. Se seleccionó el modo para procesar el ensayo ABBOTT CHAGAS ANTICUERPOS EIA.
- iv. Se blanqueó el instrumento con el blanco de sustrato válido.
- v. Se determinó las absorbancias de los controles y de las muestras.

7. Set de reactivos PATHOZYME CHAGAS:

- a. Se diluyó los controles y las muestras 1:25 añadiendo 20 μ l de muestra o control a 480 de diluyente de suero.
- b. Se agregó 100 μ l de las diluciones a cada pozo.
- c. Se incubó 60 minutos a 37°C.
- d. Se descartó el contenido de los pozos y lavó 3 veces con el buffer de lavado.
- e. Se agregó 100 μ l del conjugado a cada pozo, mezclándose cuidadosamente 5 segundos.

- f. Se incubó 30 minutos a 37°C.
- g. Se descartó el contenido de los pozos y lavó 3 veces.
- h. Se agregó 100 *ul* del sustrato a cada pozo y mezcló cuidadosamente 5 segundos.
- i. Se incubó en obscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- j. Se agregó 100 *ul* de la solución de parada a cada pozo. Agitándose 30 segundos.
- k. Se hizo la lectura a 450 nm.

8. Set de reactivo TEST ELISA PARA CHAGAS:

- a. Se colocó 200 *ul* de la solución de dilución de suero en cada uno de los pocillos que se utilizaron.
- b. Se agregaron 20 *ul* de suero a cada pocillo. Incluyéndose 1 control positivo alto, 2 controles positivos bajos y 2 controles negativos.
- c. Se selló la placa con el papel autoadhesivo provisto, para impedir la evaporación de los reactivos e incubó por 30 minutos a 37°C +/- 1.
- d. Se lavó 4 veces de forma manual la placa con solución de lavado diluida, eliminando la solución después de cada lavado.
- e. Después del último lavado se puso la placa invertida golpeándole suavemente sobre el papel absorbente. No se permitió que la placa se secase.
- f. Se agregó 100 *ul* del conjugado a todos los pocillos.
- g. Se selló la placa de la misma forma que el punto C, e incubó por 30 minutos a 37°C +/- 1. Se lavó la placa de manera similar a la descrita en los puntos D y E.
- h. Revelado: se agregó 50 *ul* de Substrato A y luego 50 *ul* de Substrato B a cada pocillo, se incubó la placa a oscuridad absoluta y a temperatura ambiente durante 30 minutos exactos.
- i. Se detuvo la reacción agregando 100 *ul* de H₂SO₄ 3N a cada pocillo. Los pocillos positivos inicialmente de color azul intenso se tornan amarillos; los pocillos negativos, incoloros o levemente azulados, permanecieron incoloros o presentaron una leve coloración amarilla.
- j. La placa se leyó utilizando un lector de microplaca, usando un filtro de 450 nm. Se consideró negativas a las muestras que presentaron una absorbancia menor al valor de corte = 0.35 (X control positivo bajo + X control negativo); y positivas a las que presentaron una absorbancia mayor a este valor.

E. DISEÑO DEL ESTUDIO:

1. Tipo de estudio:

Este estudio fue de tipo descriptivo, transversal, prospectivo.

2. Diseño de muestra:

El muestreo de la investigación fue de tipo no probabilístico por conveniencia. Las pruebas se aplicaron a 89 sueros provenientes de estudios previamente realizados en el Departamento de Citohistología, los que fueron escogidos por conveniencia y distribuidos de la siguiente forma: 30 sueros con reactividad positiva a tres diferentes metodologías, 30 sueros con reacción inespecífica o dudosa y 30 sueros negativos, así como los controles positivo y negativo de cada presentación. El trabajo experimental fue un estudio ciego, para lo cual a tanto las muestras como a los reactivos se les asignó un código para su proceso buscando la objetividad de los resultados.

3. Análisis de resultados:

Los resultados obtenidos fueron comparados con los datos de estudios anteriores en el departamento de citohistología. Así una muestra se consideró positiva, negativa o dudosa de acuerdo a la reactividad, que presentara a tres diferentes metodologías entre ellas: ELISA, IHA, RLAT y/o IFI. Las muestras escogidas para el estudio se determinaron positivas por presentar reactividad a tres técnicas diferentes, las muestras dudosas dieron reactividad a una de las tres técnicas y las negativas sin ninguna reacción a tres pruebas.

Los datos obtenidos fueron analizados en tablas de contingencia de 2X2 en el programa Epi Info versión 6.02, de las cuales se obtuvieron los índices estadísticos de las pruebas evaluadas como: sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo, valor predictivo negativo y exactitud.

Los criterios para recomendar el reactivo que se adecúe al diagnóstico de la enfermedad de Chagas en nuestro medio serán las pruebas que presenten altos índices de sensibilidad, especificidad, exactitud y valor predictivo positivo y negativo.

VIII. RESULTADOS

Para la realización de este estudio fueron seleccionados por conveniencia 89 sueros de la seroteca del Departamento de Citohistología, los cuales habían sido analizados por diferentes metodologías como Inmunofluorescencia indirecta, Inmunoensayo enzimático, Hemaglutinación indirecta, Aglutinación con partículas de gelatina, Aglutinación con partículas de látex y cultivo; algunos de estos sueros fueron evaluados por todos y / o al menos por tres de estas diferentes técnicas.

La población de sueros se distribuyó de la siguiente forma: 36 muestras consideradas positivas por presentar una reactividad positiva a un mínimo de tres diferentes metodologías y 63 muestras consideradas negativas bajo el mismo criterio. Entre la población de muestras negativas se incluyó intencionalmente 23 catalogados por este estudio como sueros problema, por haber dado una reacción positiva a una de tres metodologías diferentes. Sin embargo, éstos sueros fueron considerados negativos ya que según el criterio de la OMS, deben de obtenerse mínimo dos pruebas serológicas diferentes con el mismo resultado a fin de confirmar una infección.

Los reactivos evaluados durante el estudio comprendieron tres grupos de diferentes metodologías: El grupo No. 1 conformado por la prueba de membrana en el que se incluyó: reactivo **A**, el grupo No. 2 que incluyó aglutinación por medio de partículas de látex: al reactivo **B** y el grupo No. 3 con los reactivos de inmunoensayo enzimático: a los reactivos **C, D, E, F, G, H e I** (ver tabla 1).

Tabla No. 1

**COMPARACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES
PRINCIPIOS DE LOS METODOS**

REACTIVO	MATERIAL ANTIGÉNICO	MATERIAL RECUBIERTO
A	Anticuerpo específico anti <i>T. cruzi</i> combinado a una proteína conjugada a partículas inertes y antígeno unidos a una base sólida, no especifican estadio	Placas inmunocromatográficas recubiertas de material antigénico
B	Antígenos citoplásmicos y de membrana de <i>T. cruzi</i> en presencia de un líquido de contraste	Suspensión al 1% de partículas de látex sensibilizadas
C	Antígeno de <i>T. cruzi</i> , no especifican estadio	Esferas recubiertas de antígeno
D	Antígeno purificado de <i>T. cruzi</i> , no especifican estadio	Pozos recubiertos de antígeno purificado
E	Antígeno citoplásmico y de membrana de <i>T. cruzi</i> , no especifican estadio	Microplaca con pozos que contienen antígenos citoplásmicos y de membrana de <i>T. cruzi</i> inmovilizados
F	Antígeno citoplásmico y de membrana de <i>T. cruzi</i> , no especifican estadio	Policubeta con pocillos que contienen antígenos citoplásmicos y de membrana de <i>T. cruzi</i> inmovilizados
G	Antígeno recombinante de <i>T. cruzi</i> a partir de proteínas específicas de los estadios de epimastigote tripomastigote	Pozos recubiertos de antígenos recombinantes inmovilizados
H	Antígeno de <i>T. cruzi</i> , no especifican estadio	Pozos con adhesivo biológico para la activación de las placas recubiertas con antígeno de <i>T. Cruzii</i>
I	Antígeno recombinante específico de <i>T. cruzi</i> , no especifican estadio	Pozos recubiertos de antígeno recombinante

Durante el proceso de la evaluación de los 89 sueros, a cada uno se les asignó un código y se trabajó en ciego para así buscar la objetividad de los resultados. Todos los reactivos fueron procesados siguiendo las estrictas indicaciones señaladas en los procedimientos de las diferentes casas comerciales. Se incluyeron los diferentes controles positivo y negativo durante el proceso de cada ensayo individualmente. Los juegos de reactivos de casas comerciales que requirieron equipo especial fueron procesados en instituciones estatales como el Banco de Sangre del Hospital General "San Juan de Dios" y en laboratorios particulares como el Laboratorio Clínico Santa Elisa y el Centro de Referencia de Inmunoanálisis, quienes contaban con el equipo necesario para ello.

RESULTADOS AGRUPADOS SEGÚN CONCLUSIÓN

Con los datos obtenidos de cada suero se determinó la sensibilidad, especificidad, exactitud, valor predictivo positivo y valor predictivo negativo de los diferentes juegos de reactivos comerciales. Utilizando como estándar de referencia la reactividad positiva de los sueros en al menos tres metodologías diferentes, y la reactividad negativa de los mismos a tres metodologías distintas. (Cuadro reportado por el Departamento de Citohistología)

	C	A	E	F	G	B	I	H	D	CONCLUSIÓN SEGÚN DEPTO. CITOHISTOLOGIA
Positivos	40	24	28	34	38	31	43	38	27	36
Negativos	49	51	60	55	50	56	45	51	60	30
No Reacciona	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Dudosos	0	12	1	0	0	2	1	0	2	23

Los índices estadísticos fueron analizados por el programa estadístico Epi Info versión 6.02 que proporcionó los resultados de los mismos así como el intervalo de confianza de estos.

Las pruebas del reactivo de la prueba rápida de membrana **A** presentó una especificidad del 92.5%, mientras que la prueba de aglutinación de partículas de látex presentó un 90% (Ver tablas No. 3 y No. 4). Los juegos de reactivos de inmunoensayo enzimático evaluados presentaron un rango de especificidad del 84.9 al 100%.

En relación a la sensibilidad la prueba rápida de membrana presentó 63.9%, la de látex 77.8 y las de inmunoensayo enzimático un rango 77.8% - 100%.

En lo que respecta al valor predictivo positivo el rango obtenido fue de 81.8 - 100%, siendo la prueba D la que presentó n 100%; sin embargo al tomar en cuenta el índice de prevalencia de la Enfermedad de Chagas adquirida de 0.18 % el rango oscila de 0.12 a 0.73%.

El rango de valor predictivo negativo fue 79 – 100% para los juegos de reactivos evaluados, siendo las pruebas C e I las únicas que dieron un 100%, aunque tomando en cuenta la prevalencia de la enfermedad todos los reactivos demuestran un 100% del valor (Ver tabla No. 5).

Tabla No. 3

PRUEBA RAPIDA DE MEMBRANA

Reactivo	Sensi	IC	Espe	IC	Vp+	IC	Vp-	IC	Exact	Pvp+	Pvp-
A	63.9	46.2-78.7	92.5	80.9 – 97.6	85.2	65.4 - 95.1	79	66.5 - 87.9	80.68	0.15	100

Tabla No. 4

AGLUTINACION DE PARTICULAS DE LÁTEX

Reactivo	Sensi	IC	ESPE	IC	Vp+	IC	Vp-	IC	Exact	Pvp+	Pvp-
B	77.77	60.4 - 89.3	90.56	83.4 – 98.5	84.84	73.1 - 97.5	90.3	74.1 - 93.4	83.9	0.14	100

Tabla No. 5

INMUNOENSAYO ENZIMATICO

Reactivo	Sensi	IC	Espe	IC	Vp+	IC	Vp-	IC	Exact	Pvp+	Pvp-
C	100%	88 – 100	92.45%	81 – 98	90	75 - 97	100%	91 - 100	95.5	0.23	100
D	78.78	77.1 - 59.4	100	91.4 – 100	100	84.5 - 100	88	74.9 - 93.7	88.76	0.58	100
E	77.77	60.4 - 89.3	98.11	91.6 – 100	96.65	85 - 100	86.66	75.2 - 93.8	89.88	0.73	100
F	88.88	73 - 96.4	96.22	85.9 - 99.3	94.11	78.9 - 99.0	92.72	81.6 - 97.6	93.25	0.42	100
G	88.88	73 - 96.4	88.77	76.3 - 95.3	84.21	168.1 - 93.4	92.25	80.3 - 97.5	88.76	0.14	100
H	91.7	76.4 – 97	90.6	78.6 - 96.5	86.8	71.1 - 95.1	94.1	82.8 - 98.5	91	0.17	100
I	100	88 – 100	84.9	71.9 - 92.8	81.8	66 - 8 - 91.3	100%	90.2 - 100	91.01	0.12	100

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Siendo Guatemala un país endémico de la Enfermedad de Chagas y la hemotransfusión una de las vías de transmisión más importante, los ensayos serológicos son una alternativa aceptable para la detección de portadores de la infección, ya que inmediatamente después del inicio de la misma es probable detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos, que caracteriza a ésta en su etapa crónica.

Las pruebas de membrana y la prueba de aglutinación con partículas de látex están siendo utilizadas para el tamizaje en la detección de anticuerpos anti - *Trypanosoma cruzi* ya que se caracterizan por proporcionar resultados de una forma rápida. La evaluación realizada en este estudio demostró que la especificidad del 90% al 92.5% que presentaron estas pruebas las hace capaces de identificar a los pacientes que no presentan infección, es decir al porcentaje de individuos sanos. Sin embargo el dato obtenido de estas dos metodologías debe de confirmarse por una técnica que garantice la confiabilidad de los mismos; siguiendo con las normas que dicta la OMS para el diagnóstico de una enfermedad. De las 89 membranas del reactivo **A** se tuvo 2 membranas que no reaccionaron y 12 que dieron reacciones inespecíficas, el fallo puede atribuirse a la fecha vencida que presentaba un set de 25 membranas de los 4 sets de reactivo que fueron donados, estas membranas pertenecían al set con fecha de caducidad vencida. Los datos afectaron el cálculo total de los índices estadísticos.

Los reactivos de inmunoensayo enzimático, **C** e **I**, que presentaron un valor de sensibilidad y valor predictivo negativo del 100%; ambos sets de reactivos son capaces de diagnosticar la enfermedad de Chagas. Su elevada sensibilidad en el diagnóstico, garantiza al usuario una tasa de falsos negativos baja. Por lo que una prueba sensible es la mejor elección para descartar el diagnóstico de una enfermedad congénita o adquirida, ya que se desea un resultado negativo que sea confiable y el reactivo proporcione pocos falsos negativos. Incluso una prueba de alta sensibilidad es la mejor opción si los factores de riesgo y costo son iguales. Ambas pruebas requieren de equipo sofisticado para su ejecución, aunque el costo del kit de reactivos sea accesible al bolsillo.

El reactivo **D** que presentó un 100% de especificidad y valor predictivo positivo; su elevada especificidad proporciona una tasa de falsos positivos baja; siendo esta la prueba ideal para el tamizaje de donadores en un banco de sangre. El reactivo de esta casa comercial además de ser accesible en el mercado, es de fácil ejecución y no necesita de equipo sofisticado para su ejecución. Sin embargo al tomar en cuenta el índice de prevalencia de 0.18% la Enfermedad de Chagas adquirido en nuestro país los valores predictivos positivo y negativo varían puesto que la proporción de quienes padecen la enfermedad realmente es baja, puesto que el blanco de un test es proporcionar un diagnóstico acertado.

La sensibilidad y especificidad moderada que presentaron los reactivos **D, E, F, G y H** fundamentan sus metodologías, por ejemplo a un adhesivo biológico que activa las placas e inmoviliza el antígeno, ofreciendo una estabilidad durante el ensayo. Algunos basan su metodología en técnicas bioquímicas utilizando ADN recombinante a partir de proteínas específicas del antígeno, asegurando que la mezcla antigénica brinda resultados reproducibles y de elevada sensibilidad. A pesar de los avances tecnológicos que actualmente brindan las diferentes casas comerciales al poner a disponibilidad los denominados ensayos de tercera generación, que se basan en la utilización de proteínas específicas de los diferentes estadios de *Trypanosoma cruzi*, existe variabilidad en las especies y entre regiones, lo que hace ineficaz al reactivo para el diagnóstico de la enfermedad.

Durante el estudio se asignó a los reactivos una clave, para unificar el criterio de cómo nombrar las presentaciones comerciales que distribuyen las diferentes casas comerciales. Se les pidió autorización de publicar la marca que distribuyen, a la cual algunas casas comerciales accedieron y otras no.

En el mercado de nuestro país contamos con pruebas accesibles, fácil ejecución, alto grado de reproducibilidad, sensibles, específicas y de bajo costo al alcance de los usuarios para proporcionar un diagnóstico confiable a nuestra población.

X. CONCLUSIONES

1. Los reactivos de las casas comerciales C e I presentaron un 100% de sensibilidad por lo que son capaces de diagnosticar con mayor precisión la Enfermedad de Chagas en la región de Guatemala.
2. Los tres reactivos C, I y D de inmunoensayo enzimático fueron los que presentaron mayores índices estadísticos por lo tanto son útiles para el tamizaje del diagnóstico de la Enfermedad de Chagas.
3. Las pruebas de membrana y aglutinación de partículas de látex proporcionan resultados rápidos que deben ser confirmados con técnicas más confiables.
4. Los reactivos evaluados para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas no presentan el desempeño adecuado para nuestra población debido a la baja prevalencia de la enfermedad en nuestro país.

XI. RECOMENDACIONES

1. La inspección y evaluación de los diferentes reactivos disponibles en el mercado antes de su venta debería ser una norma general que dictamine el Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
2. Los reactivos C e I, por presentar una alta sensibilidad pueden ser útiles en el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, ya sea congénita o adquirida.
3. Los reactivos D y E presentaron los valores mas altos de especificidad, por lo que podrían utilizarse en el tamizaje de donadores de Banco de Sangre.

XII. REFERENCIAS

1. Molyneux DH *et al.* TRYPANOSOMA and LEISHMANIA, Parasites of Man and Domestic Animals. International Publications Service Taylor & Francis Inc., 1,983. 294p. (p.161-181).
2. Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. La Salud en las Américas. Washintong D.C. OPS/OMS; 1,998.pp1-4. (Publicación científica No. 569).
3. Matheus A *et al.* Implications of Sudden Death in Chagas Disease. The Benjamin/Cummings publishing company. 1989. p.409 (277-279).
4. Aguilar F. Historia de la Enfermedad de Chagas en Guatemala. Enfermedades Tropicales en Guatemala 93 Informe anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 1,993 1-23.
5. Ministerio de Salud Pública y Asistencia social. Homenaje al cincuentenario del descubrimiento de la enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) 1,909-1,959. Guatemala: Instituto de Enfermedades Tropicales "Doctor Rodolfo Robles", 1,959. 36-42p.
6. De León MP, Matta V. Estudio clínico, serológico y epidemiológico de la enfermedad de Chagas en Santa María Ixhuatán, Santa Rosa. Guatemala Universidad de San Carlos de Guatemala. (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1,997. 23-25p.

7. Monroy C *et al.* Resultados preliminares de la situación actual en la distribución de los vectores de la enfermedad de Chagas a nivel nacional. *Enfermedades Tropicales en Guatemala 96 Informe anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)*. 1,996;5:137-162.
8. Aguilar F. *Parasitología Médica*. Guatemala: Litografía Delgado. 1,987.366p. (p.250-260).
9. Valdespino JL *et al.* *Enfermedades Tropicales en México; Diagnóstico, Tratamiento y Distribución geográfica*. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (Secretaría de Salud). 1,994. 381p. (p. 279-292).
10. Zarreras M *et al.* *Medicina Interna de Zarreras*. Harper Publishers. 1,992. 3,420p. (p.2449-2450).
11. De Tercero C *et al.* Amastigotes de *Trypanosoma cruzi* en la placenta de recién nacidos con enfermedad de Chagas congénita. *Enfermedades Tropicales en Guatemala 96 Informe anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)*. 1,996;5:114-117.
12. Pinto Díaz JC. Epidemiology of Chagas' disease. p.49-80 [In Wendel S., *et al* Chagas' disease (American Trypanosomiasis); its impact on transfusion and clinical medicine]. Brazil; International Society of Blood Transfusion, 1,992 X+270 p.
13. Pelczar M, Reid R, Chan ECS. *Microbiología*. 4ed. Capella A, trad. México: Editorial McGraw-Hill, 1,993, XIV+826p.
14. Organización Mundial de la Salud: Serie de Informes Técnicos. Control de la Enfermedad de Chagas. OMS, trad. Ginebra: OMS, Doc. Tec. No. 811, 1,991. VI+120p.
15. Matta VL *et al.* Evaluación y Estandarización de los Métodos Serológicos para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. *Enfermedades Tropicales en Guatemala 93 Informe anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA)*. 1,993;1:79-81.

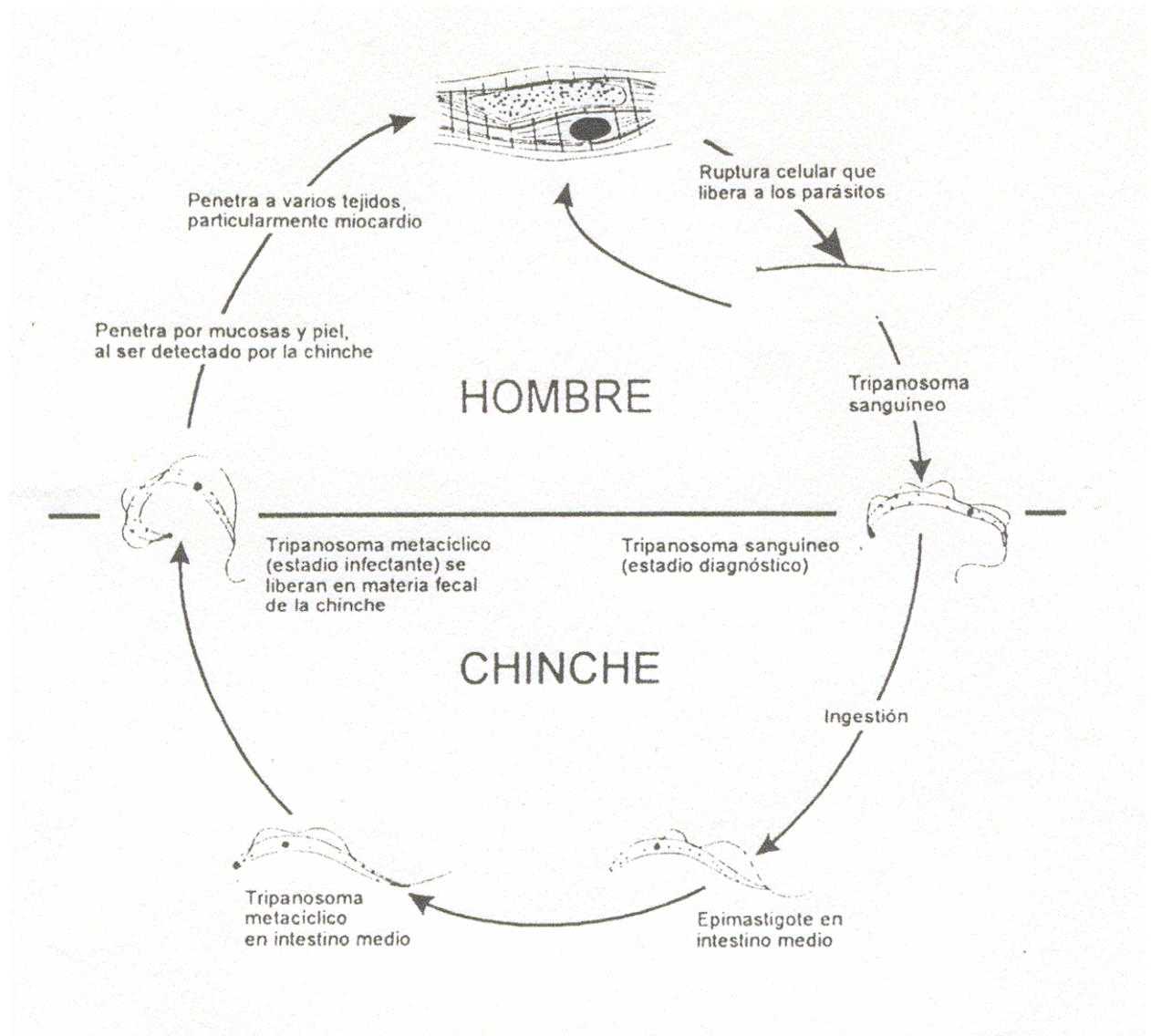
16. Joklik W *et al.* Microbiología de Zinsser, 20ed. Boxaca M, MeeroffN, Mikkelsen K, trad. México: Editorial Panamericana, 1,995, 169p.
17. Matta VL. Avances en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas en Guatemala. Enfermedades Tropicales en Guatemala 94 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 1,994;3:40-45.
18. Paz M *et al.* Valor Predictivo de las Pruebas Serológicas para el Diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Enfermedades Tropicales en Guatemala 94 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 1,994;3:46-48.
19. De León MP *et al.* La eficiencia del método de concentración de capilaridad en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Enfermedades Tropicales en Guatemala 95 Informe Anual Agencia de Cooperación Internacional del Japón (JICA). 1,995;4:15-18.
20. Garvey JS *et al.* Methods in Immunology. A Laboratory Text for Instruction an Research. The Benjamin/cummings publishing company. 1,987, 337p.
21. Manual de Técnicas de Laboratorio. Volumen III. Anticuerpos monoclonales, Biología molecular y Bioseguridad. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos Secretaría de Salud, México de 1,995.
22. Cruse JM *et al.* Illustrated dictionary of Immunology. CRC Pres, 1,995 p. 74,131.
23. Rose N *et al.* Manual of clinical laboratory immunology. 4th ed. American Society for Microbiology. 1,992, 304p.
24. Václav H. Immunological Investigation of Tropical Parasitic Diseases. Churchill Livingstone. 1,980,170p.
25. Stites DP *et al.* Inmunología básica y clínica. 7^a. Ed. El Manual Moderno. 1,993, 457p.
26. Tijssen P. Practice and theory of enzyme inmunoassay. Elsevier. 1,985, 235p.

27. Wiener Lab. Chagatest-látex. Rosario Argentina. 1,995,2p.
28. Wiener Lab. Chagatest-ELISA. Rosario Argentina. 2000, 3p.
29. Chembio Diagnostic Systems. Chagas Stat Pak. New York USA. 1,997, 1p.
30. BIOS Chile Ingeniería Genética. Test ELISA para Chagas. Santiago de Chile. 1,996,2p.
31. Gull Laboratories, Inc. Meridiam Chagas' IgG ELISA. Chicago USA. 1,998, 5p.
32. Sanofi Diagnostics Pasteur, S.A. Chagascreen ELISA. México Distrito Federal. 1,997,6p.
33. Omega Diagnostics Limited. Quorum Chagas ELISA. Ohio USA. 1,997,8p.
34. Abbott Laboratorios LTDA. Abbot Chagas Anticuerpos EIA. Sao Paulo Brasil. 1,995, 21p.

XIII. ANEXOS

ANEXO No. 1

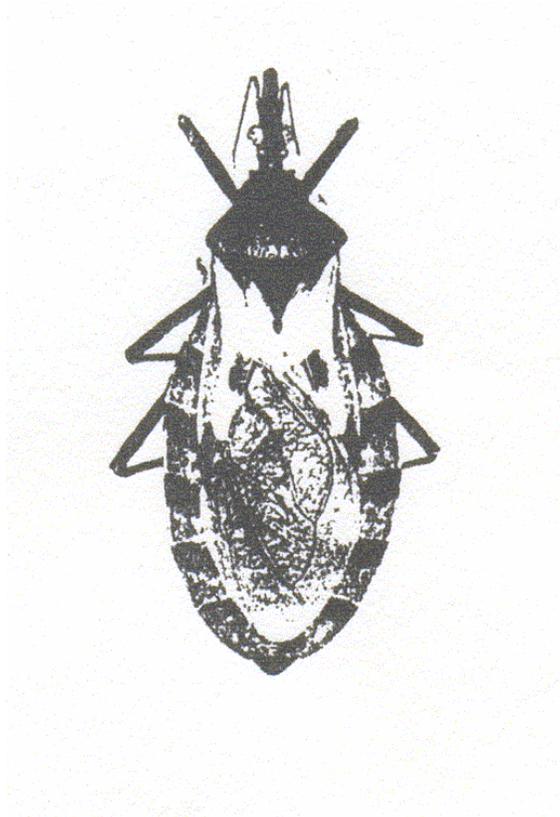
Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



REFERENCIA: Valdespino JL *et al.* Enfermedades Tropicales en México; Diagnóstico, Tratamiento y Distribución geográfica. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. Secretaría de Salud. 1994.381p.P. 282

ANEXO No. 2

Vector de la enfermedad de Chagas de más amplia distribución.

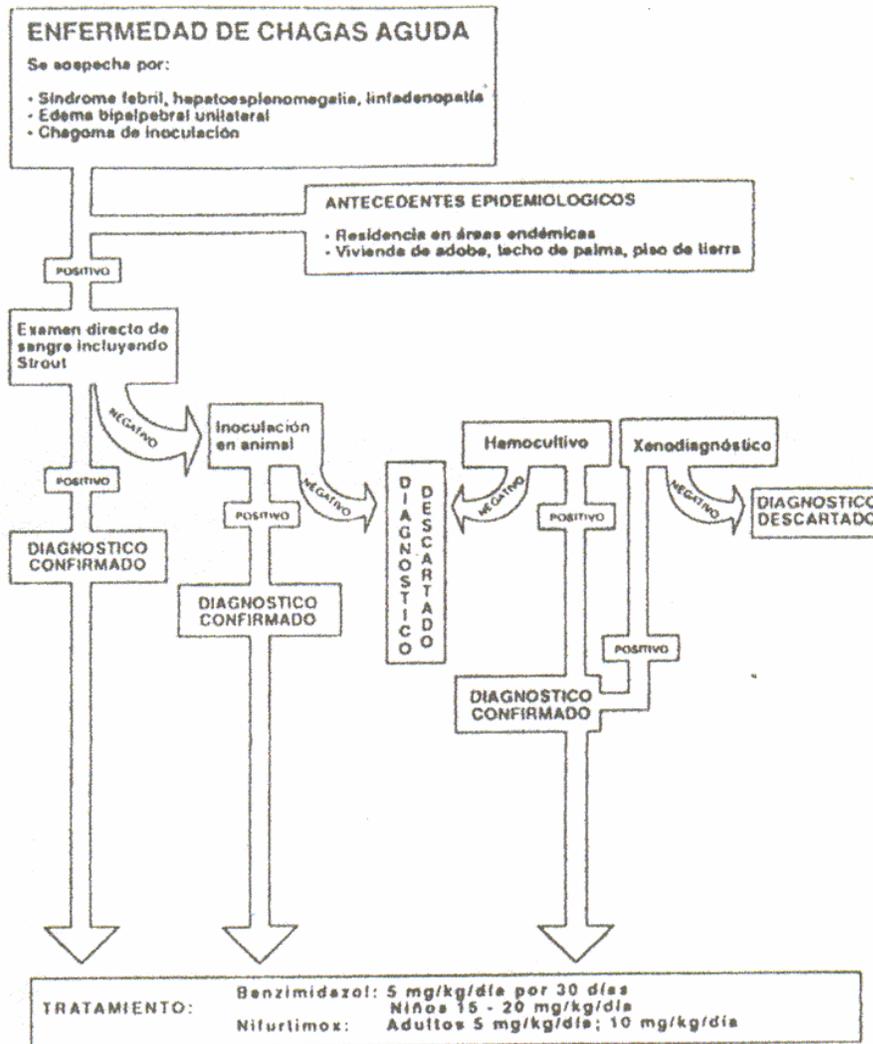


Triatoma dimidiata.

REFERENCIA: Molynux DH *et al.* TRIPANOSOMA and LEISHMANIA, Parasites of Man and Domestic Animals. International Publications Service Taylor & Francis Inc., 1,983.294p.P.177

ANEXO No. 3

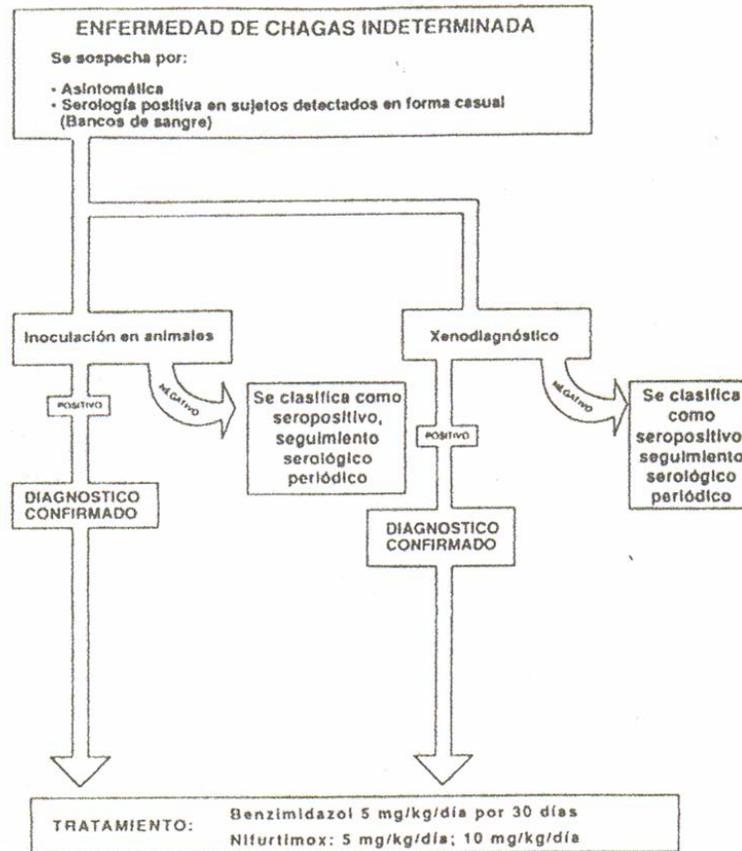
Diagnóstico y Tratamiento de la enfermedad de Chagas aguda.



REFERENCIA: Valdespino JL *et al.* Enfermedades Tropicales en México; Diagnóstico, Tratamiento y Distribución geográfica. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. Secretaría de Salud. 1994.381p.P.288

ANEXO No. 4

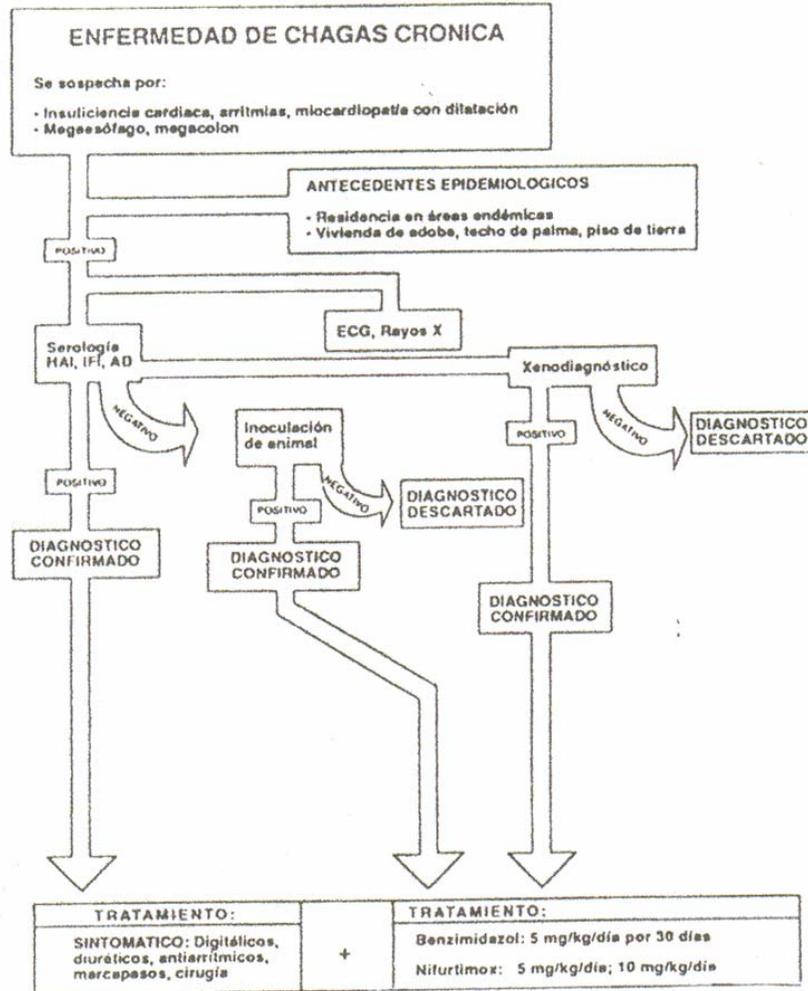
Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas indeterminada.



REFERENCIA: Valdespino JL *et al.* Enfermedades Tropicales en México; Diagnóstico, Tratamiento y Distribución geográfica. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. Secretaría de Salud. 1994.381p.P.290

ANEXO No. 5

Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica.



REFERENCIA: Valdespino JL *et al.* Enfermedades Tropicales en México; Diagnóstico, Tratamiento y Distribución geográfica. Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico. Secretaría de Salud. 1994.381p.P.289

ANEXO No. 6

10 de septiembre del 2000

Licenciada:
Eugenia Marroquín
ALMAR
Ciudad

Estimada Licda. Marroquín:

Al saludarla muy atentamente por este medio nos permitimos hacer de su conocimiento que el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se encuentra realizando una evaluación de los reactivos disponibles en Guatemala para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Esta investigación se realizará con 94 sueros, los cuales serán seleccionados de la seroteca que se encuentra en el Departamento y que contiene todos los sueros que se han coleccionado durante los más de diez años que hemos realizado estudios sobre esta enfermedad. Los sueros seleccionados comprenderán sueros positivos por hemocultivo, sueros negativos por hemocultivo y otras metodologías, sueros positivos a leishmaniasis y sueros de pacientes con enfermedad autoinmune. Con éste estudio se desea evaluar la sensibilidad, especificidad, valor predictivo negativo y positivo, y los resultados obtenidos serán enviados a las autoridades de salud tanto del Ministerio de Salud Pública como del Seguro Social; adjunto sírvase encontrar una copia del anteproyecto de la investigación.

Tengo conocimiento que la compañía que usted representa distribuye un kit de reactivos para la detección de anticuerpos anti-*T cruzi*, por lo que por este medio solicitamos a usted su colaboración con ésta investigación en el sentido de proporcionar en calidad de donación el reactivo suficiente para el proceso de las 94 muestras.

Esta investigación será realizada en estudio ciego y al finalizar se le entregará una copia del informe final.

Agradeciendo de antemano su colaboración con ésta investigación se suscribe de usted,

Licda. Lilian Camey

Licda. Vivian Matta

