

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

TAMIZAJE NEONATAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA
REPÚBLICA DE GUATEMALA

- I. ADAPTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL MÉTODO SEROLÓGICO**
- II. ESTUDIO PILOTO EN 4 CENTROS DE ATENCIÓN DE SALUD DEL**
ÁREA ENDÉMICA

CLAUDIA FABIOLA ESTRADA GONZÁLEZ

JORGE ALBERTO RODAS CRUZ

QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, MAYO DE 2012

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

TAMIZAJE NEONATAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA
REPÚBLICA DE GUATEMALA

- I. ADAPTACIÓN Y EVALUACIÓN DEL MÉTODO SEROLÓGICO**
- II. ESTUDIO PILOTO EN 4 CENTROS DE ATENCIÓN DE SALUD DEL**
ÁREA ENDEÉMICA

SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN

PRESENTADO POR

CLAUDIA FABIOLA ESTRADA GONZÁLEZ

JORGE ALBERTO RODAS CRUZ

PARA OPTAR AL TÍTULO DE

QUÍMICOS BIÓLOGOS

GUATEMALA, MAYO DE 2012

JUNTA DIRECTIVA

Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

INDICE

I. Ámbito de la investigación	1
II. Resumen	2
III. Antecedentes	4
A.- Historia	4
B- Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i> .	5
1.- Taxonomía	5
2.- Ciclo Evolutivo de <i>T. cruzi</i> .	6
a.- Consideraciones generales	6
b.- Ciclo de transmisión de <i>T. cruzi</i> .	7
3.- Relación Hospedero-Parásito	8
a.- Insecto-Parásito	8
b.- Mamífero-Parásito	8
C.- Epidemiología	10
1.- Prevalencia e incidencia en de la enfermedad de Chagas en Guatemala	10
a.- Transmisión vectorial	10
b.- Transmisión por transfusión de sangre	11
c.- Transmisión vertical	12
d.- Formas secundarias de transmisión	14
D.- Fisiopatología	15
1.- Fase aguda	15
2.- Fase latente o indeterminada	16
3.- Fase crónica	16
E.- Manifestaciones clínicas	17
1.- Clínica del recién nacido	17
2.- Clínica de la madre	18
F.- Diagnóstico	18
1.- Diagnóstico parasitológico	19
2.- Diagnóstico serológico	19
G.- Tratamiento	20
H.- Seguimiento	22

I.- Tamizaje neonatal	23
J.- Situación actual del tamizaje neonatal	24
K.- Variantes del tamizaje neonatal	25
1.- Papel filtro	25
2.- Agentes bloqueadores y soluciones amortiguadoras	26
IV. Justificación	28
V. Objetivos	29
VI. Materiales y métodos	30
VII. Resultados	42
VIII. Discusión de resultados	49
IX. Conclusiones	55
X. Recomendaciones	56
XI. Referencias Bibliográficas	57
XII. Anexos	65

I. ÁMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

En Guatemala se han realizado estudios de la transmisión de la enfermedad de Chagas, éstos se han enfocado en el vector y la transmisión por vía sanguínea como parte del tamizaje realizado en los bancos de sangre del país.

La vía de transmisión vertical ha sido subestimada por las autoridades de salud y son escasos los estudios que se han realizado en el área endémica del país, los cuales no reflejan la realidad a nivel nacional. Debido a esta situación se realizó un estudio piloto para el tamizaje neonatal de la enfermedad de Chagas, para lo cual se adaptó un método inmunoenzimático sérico comercial a muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro y se realizó un trabajo de campo en centros de atención de salud de 4 departamentos del área endémica del país.

Este seminario de investigación fue realizado en el Departamento de Citohistología en la Unidad de Inmunodiagnóstico del Laboratorio Microbiológico de Referencia - LAMIR- y la Unidad de Investigación Inmunología de Enfermedades Tropicales de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala como parte del diagnóstico de la enfermedad de Chagas que se realiza en este laboratorio.

II. RESUMEN

Guatemala es una región endémica de la enfermedad de Chagas habiéndose reportado la presencia de los vectores que transmiten la enfermedad en 21 de los 22 departamentos, lo que hace posible su transmisión en todo el país.

Tomando en cuenta que la transmisión vertical constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas y para facilitar su detección y tratamiento oportuno, en este estudio se adaptó un método inmunoenzimático que determina anticuerpos IgG contra *T. cruzi* para ser utilizado en el tamizaje neonatal de la enfermedad de Chagas congénita. Se evaluaron dos métodos comerciales de inmunoensayos encontrándose que la combinación idónea para el análisis de muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro con el método ELISA Omega Pathozyme[®] fue: diámetro de papel filtro de 6 mm., 241 µl. de diluyente del ensayo como agente eluyente y 1 hora de elución a temperatura ambiente. En el caso de ensayo ImmunoComb[®] II Chagas Ab fue: diámetro de papel filtro de 6 mm., tiempo de elución de 1 hora directamente en la bandeja de desarrollo. Para el análisis de muestras del plan piloto se utilizó el ensayo ELISA Omega Pathozyme[®] por tener un bajo costo por unidad de prueba y por ser un método semicuantitativo que permite realizar el seguimiento a los 3, 6 y 9 meses de hijos de madres positivas.

Se realizó un estudio piloto en tres centros de salud y un hospital nacional del área endémica de Guatemala (Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa y Zacapa) y se incluyeron 455 muestras en papel filtro, entre neonatos y niños menores de 3 meses. Se obtuvo un total de 12 (2.64%) muestras con resultado positivo y 4 (0.88%) con resultado indeterminado. La confirmación se realizó con el mismo método inmunoenzimático con una muestra de sangre venosa tanto de la madre como del recién nacido. El departamento que presentó mayor cantidad de casos positivos confirmados fue Jalapa con 7 (58.33%) seguido por Jutiapa con 5 (41.67%).

El seguimiento a los niños con resultado positivo se realizó a los 3, 6 y 9 meses para evaluar presencia y título de anticuerpos, no evidenciándose ningún caso de infección congénita. La frecuencia de madres positivas confirmadas que presentan anticuerpos contra

T. cruzi fue de 2.86 %, encontrando que el antecedente de transfusión sanguínea fue la única variable que presentó una relación estadísticamente significativa ($p = 0.0424$).

Es recomendable establecer un método de diagnóstico serológico utilizando antígeno de las cepas circulantes en el país para el diagnóstico de infección congénita de la enfermedad de Chagas y realizar estudios de la prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en mujeres embarazadas en la misma región geográfica.

III. ANTECEDENTES

A.- Historia

En 1909 el investigador brasileño Dr. Carlos Chagas comunicó el descubrimiento de la nueva tripanosomiasis humana al encontrar a *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) en el examen directo de una lactante de 2 meses de edad cuya madre tenía tripanosomiasis americana y de autopsias de 2 recién nacidos que fallecieron a los 8 días con crisis convulsivas. En 1911 obtiene el primer registro de la enfermedad de Chagas congénito. En 1949 Aldao en Venezuela describió el hallazgo de *T. cruzi* en sangre periférica en un recién nacido de 2 días de vida. Posteriormente, Jorg y Romaña (1953) reportaron el primer caso de Chagas congénito en Argentina. Bittencourt (1963) en Brasil realizó diversos estudios anatomopatológicos (300 abortos; 500 fetos-mortinatos y placentas), encontrando la presencia de nidos de amastigotes de *T. cruzi* en diversos tejidos, lo que posibilitó indicar que la transmisión congénita del parásito era del 10,5% en recién nacidos con bajo peso al nacer y prematuros de madres chagásicas, así como una incidencia de transmisión de 6,2% en mortinatos de mujeres con infección chagásica. En un principio se pensó que la enfermedad de Chagas congénita producía importantes manifestaciones clínicas pero en la década del 70 se demostró que la mayoría de los recién nacidos con infección congénita son asintomáticos (1,2).

En Bolivia fueron Chapuis y cols., quienes en cuatro años y medio de estadía en el hospital pediátrico de Cochabamba (1969-1973) describieron 46 casos de la enfermedad de Chagas congénita en lactantes menores de 3 meses de edad, dándose a conocer un caso con cardiopatía congénita chagásica, otros 3 casos con megacolon chagásico congénito, en todos estos casos se pensó en una contaminación transplacentaria como causa de la enfermedad. En 1976 Howard y en 1983 Moya, comunicaron la eficiencia de diferentes agentes parasiticidas y el éxito terapéutico en relación directa con el inicio precoz del tratamiento (1-3).

En Guatemala en 1931, la enfermedad de Chagas fue descrita por el Dr. Edgard Reichnow del Instituto Tropical de Hamburgo quien identificó los primeros casos de la enfermedad en niños que vivían en la finca “Las Viñas”, ubicado en el departamento de Santa Rosa (4,5).

Blanco Salgado, en 1934 realizó un estudio de la distribución de los vectores hematófagos en Guatemala y señaló a *T. dimidiata* y *R. prolixus* como los transmisores de la enfermedad de Chagas en los departamentos de Jalapa, Chiquimula, El Progreso, Santa Rosa, Escuintla, Alta Verapaz y Baja Verapaz. Posteriormente en 1935, el Dr. De León describió los primeros casos humanos por *Trypanosoma rangeli*, que fue considerado patógeno; al mismo tiempo señaló la importancia de *R. prolixus* como vector de dicho tripanosoma (5).

La sección de Tripanosomiasis y Leishmaniasis del Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, en el período de 1952 a 1976, registró 2620 casos positivos de tripanosomiasis; mientras que el período de 1979 a 1983 se reportó únicamente 382 casos positivos y 66 casos dudosos con la prueba de hemoaglutinación indirecta (HAI) (4).

B.- Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.

1.- Taxonomía

La clasificación sistemática de este parásito es la siguiente:

Reino:	Protista
Subreino:	Protozoa
Phylum:	Sarcomastigophora
Clase:	Zoomastigophora
Orden:	Kinetoplastida
Familia:	Trypanosomatidae
Género:	<i>Trypanosoma</i>
Subgénero:	<i>schizotrypanum</i>
Especie:	<i>cruzi</i> (6)

Dentro de la familia Trypanosomatidae, el género *Trypanosoma* es uno de los más importantes debido a que incluye especies que ocasionan enfermedades en humanos, como *T. cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas y *T. gambiensi* y *T. rhodesiense*, agentes causales de la enfermedad del sueño, así como especies patógenas en animales, como *T. brucei*, *T. equiperdum* y *T. equinum*. En función del comportamiento del parásito, principalmente en el vector, el género *Trypanosoma* se ha dividido en dos grupos. El

primero, llamado Stercoraria, incluye los tripanosomas que se desarrollan en el tubo digestivo del vector, progresando en el sentido de la porción intestinal con liberación de las formas infectivas con las heces. En este grupo tenemos a *T. cruzi* y *T. lewisi*. El segundo grupo, llamado Salivaria, incluye tripanosomas que se desarrollan inicialmente en el tubo digestivo y posteriormente 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* (4,6).

2.- Ciclo evolutivo de *T. cruzi*.

a.- Consideraciones generales

T. cruzi es un parásito unicelular que altera su vida entre dos hospederos, uno invertebrado y el otro vertebrado, presentando un ciclo de vida digenético. A lo largo de su ciclo evolutivo sufren profundas alteraciones que refleja su adaptación al medio en que se localiza. Esas formas reciben nombres diferentes en función de su aspecto general, de la manera como el flagelo emerge del cuerpo celular y de la posición relativa de dos importantes estructuras intracelulares: el núcleo y el cinetoplasto (órgano de movimiento), se definen las siguientes formas evolutivas para los tripanosomatideos:

- i.- Epimastigote: (20 - 40 x 2 μm .) posee un aspecto fusiforme con flagelos anteriores al núcleo. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivos axénicos y constituye una de las formas proliferativas del *T. cruzi*. Es también la forma más fácil de cultivar *in vitro*.
- ii.- Amastigote: (2 - 4 μm) forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre; estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero, formando lo que se denomina nidos los cuales contienen gran cantidad de los parásitos que se multiplicaron por fisión binaria.
- iii.- Tripomastigote: (20 x 25 μm) forma elongada con el cinetoplasto situado por detrás del núcleo, el flagelo libre, membrana ondulante de importante extensión. Este estadio está presente en la circulación del mamífero y en la ampolla rectal el vector (tripomastigote metacíclico) (4,5).

b.- Ciclo de transmisión de *T. cruzi*

La principal vía de transmisión del tripanosoma entre sus hospederos es la transmisión vectorial (a través del vector) en la cual se pueden distinguir tres ciclos: el ciclo silvestre, el ciclo doméstico y el ciclo peridoméstico (Anexo 1).

i.- El ciclo silvestre o ciclo primitivo de *T. cruzi*, de naturaleza eminentemente zoonótica, donde el protozooario circula entre vectores y reservorios silvestres. Los ecotopos (ecosistemas) primitivos de *T. cruzi* son muy diversos, encontrándose en los desiertos norteamericanos, altiplanos andinos, florestas amazónicas y atlántica. La tripanosomiasis silvestre prefiere ambientes ecológicamente cerrados o semiabiertos, variando en las proporciones de hospederos a vectores dependiendo de una serie de factores como el clima, altitud, humedad, características fauno florísticas y disponibilidad de alimentos. En este contexto se encuentra en toda América, albergándose el parásito en mamíferos de medio y pequeño tamaño y los insectos vectores. Se trata de un estado de equilibrio desarrollado a través de una larga adaptación que se traduce en la baja o ninguna acción patogénica del protozooario sobre sus hospederos naturales (7,8).

ii.- El ciclo doméstico, en el cual el hombre sobresale como principal reservorio de la infección, llevando al parásito hacia las zonas urbanas y hacia nuevas regiones y países no endémicos. Este ciclo está definido por factores antroponóticos haciendo del hombre uno de los últimos reservorios naturales de *T. cruzi*. La expansión de la enfermedad de Chagas después de la llegada de Cristóbal Colón, es el producto de una ocupación errática y de una ocupación desprogramada de América Latina basada en tres elementos principales:

- 1) Profundas acciones sobre el medio natural como quema y tala de grandes extensiones, promoviendo la apertura de espacios naturales y trayendo a ecosistemas artificiales los reservorios y vectores del parásito.
- 2) La existencia de viviendas de mala calidad los que son un excelente abrigo de los vectores.

3) Migración de los campesinos, transportadores de la infección hacia las grandes ciudades y la existencia de vectores con una alta capacidad de domiciliación, caso típico del *Triatoma infestans*.

iii.- El ciclo peridoméstico en este intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que libremente entran y salen de las residencias y los triatomas silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por el alimento. Este ciclo sirve de unión a los ciclos silvestre y doméstico. Algunos autores lo incluyen en el ciclo doméstico (7).

Además, la transmisión de la enfermedad de Chagas puede ser también en función de múltiples características eco-biológicas como: adaptación al medio domiciliar, ciclo evolutivo breve, extraordinario potencial reproductivo y tiempo breve entre la alimentación y defecación (7,8).

3.- Relación hospedero-parásito

a.- Insecto-Parásito

Parte del ciclo biológico de *T. cruzi* es en el hospedero invertebrado que se convierte en el principal reservorio infeccioso, este se infecta cuando ingiere sangre de animales ya infectados. Al llegar al estómago, las formas tripomastigotes se transforman a epimastigotes. Enseguida, los parásitos migran hacia el intestino, donde se multiplican por fisión binaria como formas epimastigote (9).

En la parte posterior del intestino ocurre la transformación hacia las formas tripomastigote (metacíclicas). Al alimentarse estos insectos, defecan y dejan las deyecciones con parásitos llamados tripomastigotes metacíclicos (10).

b.- Mamífero-Parásito

El ciclo evolutivo de *T. cruzi* en el hospedero vertebrado, comienza cuando las formas tripomastigotes y epimastigotes son eliminadas en las heces y orina del insecto vector y son inoculadas en la piel o mucosas del vertebrado. Después de penetrar en la célula hospedera, las formas epimastigotas y tripomastigotas pueden ser encontradas en el interior de una vacuola, llamada vacuola parasitófora. Después de algún tiempo se transforma a la forma amastigota, la cual se encuentra ahora libre en el citoplasma de la

célula hospedera, e inicia el proceso de división celular binaria que al finalizar permite la transformación a la forma tripomastigote. Posteriormente, comienzan un movimiento intenso que es el responsable de la ruptura de la célula hospedera, con la liberación subsiguiente de cientos de tripomastigotes al espacio intercelular. Estas formas son capaces de invadir nuevas células en el mismo sitio donde fueron liberadas o salir al torrente circulatorio y distribuirse por todo el organismo (11).

La adaptación biológica del parásito para sobrevivir en un medio inmunológicamente hostil es un determinante de virulencia del parásito, lo que se representa en una evasión inicial a la acción del complemento por medio de la inhibición de la activación de la cascada del complemento, de la opsonización del parásito y de la lisis del parásito (11).

En cuanto la infección por *T. cruzi*, se sabe que puede ingresar a distintos tipos de células mediante el reconocimiento ligando-receptor en el que están involucradas glicoproteínas y proteínas tipo lectina presentes tanto en la superficie del parásito como en la célula hospedera. La unión de *T. cruzi* ocurre mediante la acción de moléculas tales como la Fibronectina (Fn) en células fagocíticas y no fagocíticas, la cual actúa como puente facilitando la entrada del parásito. Todos los estadios del parásito se unen a Fn, factor derivado del suero y utilizado por el parásito para facilitar la unión pero solo los estadios virulentos están capacitados para el éxito en la entrada a células no fagocíticas (11,12).

Los sitios donde se encuentra concentrado el ácido siálico en la superficie de la célula juegan un papel importante en la entrada del parásito. *T. cruzi* posee un receptor específico sialyl el cual puede ser transialidado por la acción de la enzima neuraminidasa, que es una transialidasa del parásito. Sin embargo, la presencia del ácido siálico, dificulta la adhesión de estas formas a los macrófagos (12).

Se detecta la intervención de la proteasa de cisteína, más conocida como cruzipain, la cual no es un factor de virulencia en su estricto sentido, pero sí es una molécula requerida para la multiplicación intracelular y la transformación del parásito. Los inhibidores de esta proteasa promueven el bloqueo de la transformación intracelular, lo cual indica que la cruzipain puede ser una molécula en estudios de nuevas terapias contra *T. cruzi* (12).

La sobrevivencia de *T. cruzi* depende en gran parte de las proteínas y glicoconjugados que median la interacción parásito-hospedero. La mayoría de estas moléculas son ancladas a la membrana por el glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (12,13).

En cuanto a la evasión por parte del parásito a los mecanismos de defensa intracelular, cabe destacar que *T. cruzi* se escapa de la vacuola parasitófora. El escape es facilitado por la acción lítica de una toxina Tc-Tox formadora de poros, la cual es secretada por el parásito y está mediada por la transialidasa neuraminidasa, complejo enzimático que posee el parásito y por medio del cual ocurre la transferencia de uniones alfa del ácido siálico de la célula a la membrana del parásito, proporcionándole al parásito la resistencia a la acción de Tc-Tox. Se ha encontrado que tripomastigotes altamente infectivos, poseen grandes cantidades de neuraminidasa y que además esta enzima influye en las células del sistema inmune del hospedero deprimiendo su acción (13).

C.- Epidemiología

1.- Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Chagas en Guatemala

Actualmente en Guatemala, se estima que 4 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad, 730,000 personas están infectadas y aproximadamente 30,000 se infectan cada año. El grupo de edad más afectado es el de menores de 15 años y mujeres jóvenes, aunque el diagnóstico por tamizaje en bancos de sangre y sintomatología es en donadores de 25 a 39 años que corresponde a la población económicamente activa en la sociedad, limitando su desarrollo (14,15).

La transmisión del parásito puede ser de las siguientes formas:

a.- Transmisión vectorial

La vía vectorial representa del 80-90 % de transmisión. La infección vectorial en zonas endémicas tiene un fuerte impacto en el niño durante los primeros meses y años de vida, existiendo un generalizado acuerdo en que la mayoría de los nuevos casos ocurren en edades pediátricas (13,16).

El área chagásica en Guatemala (Anexo 2) está ubicada principalmente en los departamentos de: Chiquimula, Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, El Progreso, Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Quiché y Huehuetenango, sin embargo los principales vectores

de la enfermedad de Chagas en Guatemala se encuentran presentes en 21 de los 22 departamentos, con excepción de Totonicapán, lo que hace posible su transmisión en todo el país. Por ejemplo, en Guatemala, *T. dimidiata* parece estar asociada con niveles más bajos de seroprevalencia humana en comparación a *R. prolixus*. En una aldea del departamento de Zacapa donde *R. prolixus* era el principal vector, la seroprevalencia entre 373 personas analizadas fue de 38,8%. En otra aldea en el departamento de Santa Rosa, donde el único vector encontrado fue *T. dimidiata* se obtuvo una tasa de seroprevalencia de 8,9% para *T. cruzi* entre 428 habitantes. Esta tendencia también se observó en Honduras en una región donde el 35% de viviendas fueron infestadas con *R. prolixus*, la seroprevalencia en la población fue del 40%, mientras que en otra área, donde sólo *T. dimidiata* estuvo presente, la prevalencia de la infección humana era sólo el 15%. Estos resultados sugieren que *R. prolixus* es un vector más eficiente que *T. dimidiata* (14,16).

Desde el año 2000 se iniciaron rociamientos a las localidades que presentaban vectores en las casas de los habitantes del departamento de Chiquimula, esto por parte del proyecto de Chagas del Ministerio de Salud y Agencia de Cooperación Internacional de Japón (JICA), luego de esto Komori K. y col., realizaron una comparación de serología de 1998 y 2006 en Chiquimula. En el año 1998 la seroprevalencia de Jocotán fue de 12.1% y Camotán de 11.1% y en el años 2006 se redujo a 4.3% y 1.6 % respectivamente (17,18).

b.- Transmisión por transfusión de sangre

Las dificultades económicas en América Latina han estimulado la migración a zonas urbanas en las seis últimas décadas. La migración de las zonas rurales a urbanas si bien reduce el número de personas expuestas al vector infectado, aumenta la probabilidad de transmisión por transfusión. En cuanto no se descarte la sangre de donadores contaminados, existirá la probabilidad de transmitir la enfermedad por esta vía, siendo los más expuestos los individuos poli transfundidos, tales como hemofílicos y los que reciben diálisis. De igual manera sucede durante el período neonatal y el primer año de vida, etapas en las que un elevado número de enfermedades demanda terapia con hemoderivados (15,19).

Mazariegos y cols. en 1986, estudiaron el porcentaje de infección por *T. cruzi* en diferentes bancos de sangre de Guatemala, en el Hospital General San Juan de Dios de los 759 sueros 37 resultaron positivos para la enfermedad de Chagas, en el Hospital Roosevelt

de 290 sueros 22 resultaron positivos y en el hospital del Departamento de Chiquimula de 24 sueros 4 fueron positivos, confirmando así la persistencia del riesgo de transmisión de *T. cruzi* por transfusión sanguínea (19).

Morales y cols. en 1991, estudiaron 275 sueros de todos los donantes que asistieron al banco de sangre del Hospital Nacional de Chiquimula. Los donantes del estudio presentaron edades comprendidas entre 18 a 45 años, siendo en su mayoría del sexo masculino procedentes del área rural del departamento. De las 275 muestras recolectadas, 43 resultaron positivas para la enfermedad de Chagas por la prueba hemaglutinación indirecta (HAI) y 232 fueron negativas (5).

Esta vía de transmisión es la segunda en importancia y se debe a la capacidad del parásito de sobrevivir a las condiciones de almacenamiento en los bancos de sangre. En Latinoamérica se estima que el riesgo de infección después de una transfusión con una unidad de sangre o derivados infectados varía del 14 al 49%. Este riesgo depende del estado inmunológico del receptor, del número de unidades de productos sanguíneos infectados transfundidos, de la concentración del parásito en la unidad transfundida y de la cepa del parásito (20).

c.- Transmisión vertical

Constituye la tercera vía más importante de transmisión de la enfermedad de Chagas. Este tipo de transmisión parece depender de factores ligados al parásito y al hospedero. Ocurre cuando *T. cruzi*, al igual que atraviesa las mucosas, penetra el epitelio trofoblástico (16,21).

En el transcurso del embarazo, puede ocurrir infección transplacentaria provocada por la parasitemia materna y el feto desarrolla lesiones semejantes a la etapa crónica. La enfermedad fetal representa la forma congénita de esta parasitosis (22).

En el caso de la transmisión transplacentaria *T. cruzi* produce en el huésped una infección persistente por lo cual el parásito puede encontrarse en sangre periférica tanto en la fase de la enfermedad aguda como en la crónica, siendo el riesgo de transmisión mayor en la fase aguda ya que la parasitemia es intensa. Para que exista infección transplacentaria por *T. cruzi*, los tripomastigotes existentes en la sangre de la madre alcanzan las células de Hofbauer, transformándose en amastigotes, estos al multiplicarse dentro las células liberan

nuevamente tripomastigotes que atraviesan el trofoblasto produciendo la infección del feto o embrión (22,23).

El parásito por vía sanguínea puede infectar al feto con o sin compromiso placentario; infectar la placenta sin compromiso fetal o puede no afectar la placenta y no producir infección fetal. Algunos autores sostienen que debe producirse una lesión previa en el trofoblasto para que se produzca el pasaje de *T. cruzi* aunque hay estudios que demuestran la transmisión congénita sin lesión trofoblástica. La infección fetal puede producirse tanto en etapas tempranas o tardías de la gestación, no existiendo ningún período exento del riesgo. Queda por dilucidar por qué no todos los hijos de madres chagásicas adquieren la infección. Posiblemente, como lo demuestran estudios experimentales, la cepa parasitaria sería determinante (22,23).

En la enfermedad de Chagas congénito la transmisión placentaria depende directamente de dos indicadores epidemiológicos básicos:

- a.- La tasa de prevalencia de la infección chagásica en mujeres embarazadas: es influenciada por diferentes factores, los más importantes son el grado endémico en el área geográfica de procedencia y/o residencia, el nivel socioeconómico y la predisposición individual (1,2, 22).
- b.- La incidencia de la transmisión vertical: depende de diferentes factores como la metodología de estudio, tipo de población estudiada, zona geográfica y su situación epidemiológica; diferencias genéticas, inmunológicas y nutricionales de la madre, etc. La mayoría de las embarazadas infectadas no presentan signos o síntomas atribuibles a la enfermedad de Chagas dado que las manifestaciones clínicas suelen observarse luego de la edad fértil, además la posibilidad de que una embarazada esté en estadio agudo de la enfermedad incrementa el riesgo de transmisión (1,22,23).

Se desconocen los factores que condicionan la infección transplacentaria debido a que no todos los hijos de madres chagásicas adquieren la infección, la incidencia de la enfermedad de Chagas congénito varía de 2,1 a 28,2 % en Chile, en Argentina de 0,5 a 10,4%, 0,5 a 4,0% en Uruguay y Paraguay 10%. Los reportes actuales en Bolivia muestran que la tasa de transmisión congénita (TTC) en madres seropositivas, en promedio es de 5 a 6%. En el área no endémica se suelen observar casos de la enfermedad de Chagas

congénito de segunda generación en la que la abuela es procedente de área endémica, la madre nacida en área no endémica, sin antecedentes migratorios o de transfusión y el hijo positivo (2,21).

En Guatemala, Villagran y cols., investigaron la correlación entre las manifestaciones clínicas, serológicas y la infección congénita en un área endémica de Guatemala en 40 recién nacidos de 39 madres chagásicas. Al nacimiento, los 40 niños fueron positivos con IgG anti-*T. cruzi* por ensayo inmunoenzimático (ELISA). Al año, 32 niños presentaron un incremento de anticuerpos lo que indica una producción activa de anticuerpo. Se encontró que la incidencia de la infección congénita es entre el 0.05-5% y la manifestación clínica más común que se presentó en los recién nacidos fue el bajo peso al nacer (24).

Rivas, en 1994 realizó la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* en madres y neonatos en el hospital nacional de Chiquimula, demostrando que existe la transmisión congénita de la enfermedad de Chagas ya que encontró un 17.03% de madres portadoras. El 6.07% de parejas presentó anticuerpos IgM contra *T. cruzi*, lo que demostró la posible transmisión congénita de la enfermedad de Chagas. Estas parejas fueron confirmadas y analizadas para anticuerpos IgG por inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayo inmunoenzimático (ELISA) para IgM, obteniéndose 4 parejas en que ambos madre y neonato fueron positivos para todas las pruebas (23).

d.- Formas secundarias de transmisión:

Otras vías de transmisión son por contaminación accidental en el laboratorio como la manipulación de chinches, animales infectados, cultivo de parásitos y materiales biológicos de personas infectadas. Además, el trasplante de órganos, la transmisión por otros vectores y la ingesta de sangre, carne y secreciones de mamíferos infectados, así como cualquier alimento contaminado con heces del vector no representan una importancia significativa en términos de salud pública (21,25).

La transmisión por la leche materna constituye una vía potencial al haberse demostrado la presencia del parásito, no obstante, no existen publicaciones sobre la evidencia de esta vía de transmisión, probablemente por las dificultades que plantea el diagnóstico, así como la diferenciación con la transmisión congénita (24).

Otras formas menos frecuentes de transmisión materna de la enfermedad de Chagas son por contaminación oral a través del líquido amniótico y hematogena en el trabajo de parto (25).

D.- Fisiopatología

1.- Fase aguda

La fase aguda de la enfermedad es generalmente asintomática, sólo 1-2% de los pacientes presentan síntomas, los cuales se presentan 1-2 semanas después de adquirir la infección. Cuando la sintomatología se hace evidente, es común encontrar una reacción inflamatoria en el sitio de entrada del parásito (conjuntiva o piel), conocida con el nombre de chagoma. Cuando compromete el párpado constituye el signo de Mazza Romana, además se produce diseminación linfática y hematogena de parásitos intracelulares en ganglios linfáticos y órganos como: bazo, médula ósea, corazón, tubo digestivo, glándulas suprarrenales, cerebro y a veces ovarios, testículos y tiroides. En esta etapa, las manifestaciones clínicas son más frecuentes en niños, donde la enfermedad puede ser mortal. En el adulto se puede observar casos de mortalidad, pero con mayor frecuencia puede pasar desapercibida o presentarse en forma moderada (26)

La fase aguda se resuelve espontáneamente en 4-8 semanas. Un pequeño número de pacientes, generalmente niños, desarrollan miocarditis aguda o meningoencefalitis que pueden ser fatales. En estos casos, los estudios post-mortem muestran presencia de numerosos parásitos en su estadio de amastigotes, en los músculos liso, esquelético y cardíaco así como también en las células gliales del sistema nervioso. En individuos que adquirieron la infección por transfusión, particularmente pacientes inmunosuprimidos, la fase aguda puede ser fulminante con daño cardíaco y del sistema nervioso central (SNC) (26,27).

La infección congénita con *T. cruzi* puede producir aborto, muerte intrauterina o enfermedad aguda, la cual puede detectarse al momento de nacer pero se hace evidente varias semanas después. La mortalidad de la enfermedad congénita es secundaria a miocarditis, neumonitis o encefalitis (21,27).

2.- Fase latente o indeterminada

Este período va desde el final de la fase aguda hasta la aparición de los primeros síntomas de la fase crónica, durante esta etapa los síntomas desaparecen debido a la respuesta inmunitaria que provoca disminución de la parasitemia, pero no la eliminación completa del parásito, el cual permanece en el organismo y da comienzo a lesiones que determinarán la progresión de la enfermedad (28).

La infección puede ser rápidamente activada durante una enfermedad severa o en condiciones de inmunosupresión severa, como en el caso de pacientes que reciben un trasplante de órganos o aquellos que desarrollan SIDA (28).

3.- Fase crónica

Se caracteriza fundamentalmente por el compromiso visceral preferentemente en dos sectores, el corazón y el tubo digestivo, aunque también se ha detectado afectación del aparato urinario, glándulas suprarrenales, árbol bronquial, sistema nervioso central, cuya significación no ha sido precisada hasta la actualidad debido a su menor relevancia desde el punto de vista clínico y a la carencia de estudios de seguimiento a largo plazo (21,29).

El problema cardíaco es sin duda el compromiso más importante y frecuente de la enfermedad en esta etapa, debido principalmente por la infiltración linfocitaria originada por la intensa multiplicación parasitaria y se manifiestan principalmente como daño al tejido muscular del corazón, trastornos de la conducción de la señal eléctrica del corazón, lo que ocasiona insuficiencia cardíaca e inducción a tromboembolias. En etapas más avanzadas de la insuficiencia cardíaca se produce miocardiopatía dilatada, arritmias complejas y graves, que pueden desencadenar la muerte súbita (29,30).

A nivel del aparato digestivo la presencia de dilatación del esófago (megaesófago) y del colon (megacolon) son las más frecuentes, pero se pueden ver también a nivel del estómago, intestino delgado y vesícula biliar. Se debe por el daño local al sistema nervioso autónomo durante la etapa aguda de la enfermedad que trastorna el funcionamiento peristáltico de la musculatura, ocasiona hipertrofia muscular y aumento considerable de los órganos (30).

E.- Manifestaciones clínicas

1.- Clínica del recién nacido:

Para concluir que un recién nacido tiene infección congénita, este debe cumplir los siguientes requisitos:

- a.- Nacido de madre con serología positiva
- b.- Parásitos evidenciados al nacimiento y
- c.- Parásitos o serología positiva que no sea de origen materno, detectados después del nacimiento, sin antecedentes de transmisión vectorial o transfusional.

Para los recién nacidos infectados no existe un perfil clínico único, aunque la gran mayoría son asintomáticos (60 a 90%). Los sintomáticos tienen diferencias clínicas, serológicas y parasitológicas que pueden atribuirse a infecciones precoces o tardías en la vida intrauterina, pero también a la respuesta inmunológica del niño, la duración del estímulo antigénico y la virulencia de la cepa. Estos factores condicionan las manifestaciones clínicas muy variables que van de niños prematuros con importante morbilidad y elevada mortalidad a niños a término con un solo signo o síntoma, por ejemplo fiebre (21,27).

Los signos clínicos más frecuentes encontrados en recién nacidos son: hepatomegalia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia, meningoencefalitis, insuficiencia cardíaca y anemia (31,32).

La frecuencia de trastornos neurológicos no ha sido establecida con certeza. Algunos autores refieren que el 50% de casos neonatales presentan alteraciones de SNC. Por el contrario, en un estudio de seguimiento de 30 años no se encontraron en los pacientes manifestaciones clínicas de meningoencefalitis. Sin embargo el 30% de pacientes presentaron en forma tardía (más de 10 años) calcificaciones intracraneales, posiblemente producidas por invasión parasitaria asintomática al SNC en las primeras etapas de la enfermedad (33,34).

Freilij y cols. asistieron a 8 pacientes que nacieron de madres con la enfermedad de Chagas crónica y VIH, en 5 de ellos se comprobó la presencia de ambos agentes infecciosos. Tres tuvieron graves manifestaciones clínicas del SNC y dos fueron asintomáticos. Desde el punto de vista parasitológico, una característica observada fue el alto número de protozoarios presentes en el examen parasitológico (microhematocrito) al

momento del diagnóstico, en un niño la sospecha de la infección por VIH surgió por la gran parasitemia que presentaba (35).

Durante pocas semanas o meses pueden existir otras alteraciones inespecíficas que pueden comprobarse por exámenes de laboratorio: hipoproteinemia total, hipoalbuminemia, aumento de bilirrubina indirecta, leucocitosis discreta a moderada, linfocitosis, neutropenia, plasmocitosis, aumento de la velocidad de eritrosedimentación, elevación de alfa-2 y gama globulinas, proteína C reactiva, en ningún caso la presencia de uno o varias de estas alteraciones son específicas exclusivamente de la enfermedad de Chagas (21).

2.- Clínica de la madre

Es conocido que los adultos que tienen infección chagásica, generalmente no presentan ni signos ni sintomatología hasta etapas muy avanzadas de su vida. Las embarazadas (generalmente mujeres jóvenes) no presentan signos ni síntomas atribuibles a la enfermedad, estén en estadio agudo o crónico, pese a tener modificaciones de la inmunidad mediada por células que las susceptibiliza a infecciones. Sin embargo se ha comprobado que las embarazadas chagásicas presentan una mayor frecuencia de xenodiagnósticos positivos y un cuadro serológico sugestivo de reactivación de la lesión que permite deducir el aumento de la frecuencia y los niveles de parasitemia, siendo esta más acentuada en el tercer trimestre, lo que favorecería la transmisión transplacentaria. También se conoce que la infección materna es causa de aborto en el segundo trimestre y aumenta el riesgo de parto prematuro (21,27).

F.- Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en el trípole: clínica, epidemiología y laboratorio (Anexo 3). El diagnóstico de la infección congénita por *T. cruzi* se puede realizar adoptando los métodos parasitológicos y serológicos, que permiten demostrar tanto al parásito circulante (métodos directos), como anticuerpos específicos tipo IgG e IgM (métodos indirectos), así como determinar las implicaciones inmunopatológicas que pueden encontrarse en la madre y su neonato (Anexo 4) (34,36).

1. Diagnóstico parasitológico

Los métodos utilizados permiten detectar a los tripanosomas en la sangre periférica. Están especialmente indicados en la fase aguda de la infección ya que es en esta etapa donde existe una parasitemia elevada. El neonato chagásico se comporta como un infectado agudo, por lo tanto, el diagnóstico de infección congénita en las primeras semanas de vida se basa en la búsqueda de *T. cruzi* por medio de un método parasitológico directo. La técnica de elección es el microhematocrito (MH) ya que utiliza pequeños volúmenes de sangre, es de bajo costo, fácil procedimiento y posee sensibilidad que varía dependiendo del operador (50 - 93%). Si el niño presenta un MH negativo en las primeras semanas se deben realizar pruebas serológicas a los seis meses (23,37).

Otras técnicas y métodos parasitológicos utilizados son gota de sangre fresca, gota de sangre gruesa-frotis, concentración de Strout, hemocultivo, xenodiagnóstico y biopsia. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es una técnica que amplifica fragmentos de ADN del parásito y se detecta mediante hibridación con cebadores (fragmentos de ADN) conocidos de *T. cruzi*. Actualmente está siendo utilizada por su alta sensibilidad y especificidad, principalmente en la forma congénita de la infección y en el seguimiento del tratamiento (38-40).

2. Diagnóstico serológico

En el adulto se detecta la infección por medio de inmunodiagnóstico. Estos métodos permiten detectar anticuerpos circulantes específicos contra *T. cruzi* tanto en la fase aguda como en la crónica. Las técnicas convencionales más útiles son la hemaglutinación indirecta (HAI), ensayo inmunoenzimático (ELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) que han facilitado el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. La Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera necesaria la detección de anticuerpos anti *T. cruzi* con por lo menos dos técnicas de principio diferente. Al utilizar las técnicas de ELISA e IFI, la primera altamente sensible para el tamizaje de la infección y la segunda de elevada especificidad que complementa y ratifica el resultado obtenido en el tamizaje alcanzando el 95-98% de sensibilidad y especificidad respectivamente (34,38).

Para la embarazada es suficiente la determinación de positividad por dos técnicas diferentes. En el recién nacido tienen una validez relativa para el diagnóstico precoz de una

infección congénita, debido a que no siempre es posible la detección de IgM específica producida por el feto aunque se ha identificado por ELISA en el 50 a 60% de los casos (21,41).

Como sucede en las infecciones transplacentarias, los recién nacido infectados con *T. cruzi* tienen concentraciones de IgM más altas de lo normal. En ausencia de alteraciones de la placenta, estos hallazgos pueden indicar alguna infección intrauterina, pero no son suficientes para confirmar una infección con *T. cruzi*. La detección de IgG anti *T. cruzi* en recién nacidos son generalmente anticuerpos maternos que pasan a través de la placenta, estos anticuerpos van disminuyendo rápidamente en el transcurso de 3 meses hasta alcanzar su negativización entre los 4 a 8 meses por lo que se realiza un control serológico a los 3, 6 y 9 meses para confirmar una infección congénita (Anexo 5 y 6) (38,42).

G.- Tratamiento

El tratamiento específico de la enfermedad de Chagas continúa siendo un desafío y una de las principales preocupaciones sanitarias en los países afectados por la endemia. Se han ensayado numerosos fármacos y ninguno ha resultado absolutamente eficaz. Las drogas actualmente utilizadas para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox (3-metil-N-[(5-nitro-2-furfuril) metileno]-4- tiomorfolinoamina-1,1-dioxido) y el Benznidazol (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida), cuya actividad anti *T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace cuatro décadas (43,44).

El Nifurtimox actúa por vía de la reducción del grupo nitro de la molécula a radicales nitroaniónicos, que reaccionan con el oxígeno molecular para generar metabolitos reducidos del mismo altamente tóxicos (radicales superóxido, peróxido e hidroxilo). Docampo y cols. han demostrado que *T. cruzi* es deficiente en algunos de los mecanismos de detoxificación de metabolitos de oxígeno, particularmente del peróxido de hidrógeno, por lo que es más susceptible al estrés oxidativo que las células de vertebrados. El Benznidazol parece actuar por una vía diferente, resultante de la reacción de sus derivados nitroreducidos con macromoléculas como ADN, ARN, proteínas y posiblemente lípidos insaturados (43-45).

Ambas drogas son activas en la fase aguda (hasta un 80% de éxitos terapéuticos, definidos como cura parasitológica radical indicada por negativización de todas las pruebas

parasitológicas y serológicas), así como en la fase crónica temprana de la enfermedad (típicamente niños y adolescentes, hasta un 60% de curas). La eficacia antiparasítica de los compuestos varía según la región geográfica, probablemente como resultado de la diferente susceptibilidad intrínseca a las drogas de las cepas de *T. cruzi* que circulan en diferentes zonas endémicas (46).

Asimismo, estos compuestos presentan frecuentemente efectos adversos que incluyen:

- i. Manifestaciones digestivas: náuseas, vómitos, diarrea, baja de peso, cólicos, epigastralgias.
- ii. Alteraciones hematológicas: leucopenia, trombocitopenia que puede originar agranulocitosis y púrpura.
- iii. Alteraciones cutáneas: dermatitis atópica leve o severa (30 % de los casos).
- iv. Alteraciones neurológicas: polineuropatía, irritabilidad, insomnio, cefaleas, anorexia, parestesia, hiperestesia, mioartralgias.
- v. Otras alteraciones: estacionamiento en la curva de peso, particularmente en los lactantes, que se recupera finalizado el tratamiento.
- vi. Alteraciones cromosómicas: rupturas cromosómicas, “gaps” o fracturas en cromosoma 7, 2 y 16. Que con la suspensión de las drogas estas alteraciones desaparecen (21,36).

Sin embargo, la mayor limitación de los tratamientos actualmente disponibles es la baja eficacia ($\geq 80\%$ de fracasos terapéuticos) en la fase crónica de la enfermedad, que es la presentación clínica más frecuente actualmente en Latino América. Las razones de la marcada diferencia en la eficacia de estas drogas en las dos fases de la enfermedad no están claras aún, pero posiblemente resulten de la inadecuada farmacocinética de estos compuestos frente a la ubicación de los parásitos en tejidos profundos en la fase crónica de la infección (45).

En un estudio de seguimiento que a la fecha lleva 30 años reveló que los pacientes con infección comprobada que recibieron el tratamiento antes de los tres años de edad, negativizaron las pruebas parasitológicas y serológicas. En cambio, en los pacientes que iniciaron el tratamiento después de los tres años de edad, la respuesta serológica fue similar a la observada en pacientes adultos tratados durante el período indeterminado (35).

Durante la gestación no se puede administrar ningún tipo de tratamiento contra el parásito porque no se han realizado estudios que comprueben efectos teratogénicos que puedan ocasionar al feto o embrión (47).

Estudios llevados a cabo en las últimas 2 décadas han demostrado consistentemente que *T. cruzi*, como la mayoría de los hongos y levaduras patógenas, requiere de esteroides específicos para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de su ciclo de vida y que inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol (IBE) son potentes agentes antiproliferativos contra este parásito, tanto *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, varios estudios han conseguido que IBE comercialmente disponibles, como el ketoconazol, itraconazol o terbinafina, son incapaces de erradicar *T. cruzi* de humanos o animales con infecciones crónicas o detener el progreso de la enfermedad indicando que su actividad *in vivo* es tripanostática, no tripanocida (46).

H.- Seguimiento

El criterio de curación en el recién nacido es la negativización definitiva del examen parasitológico (MH) y sobre todo el serológico en dos controles sucesivos y por dos técnicas de principio diferente. El control de la infección se realiza por medio de exámenes serológicos al finalizar el tratamiento y posteriormente cada 6 meses hasta encontrar negativización, la negativización parasitológica habitualmente se produce alrededor de los 3 meses del inicio del tratamiento (48).

Se ha documentado si el niño es menor de un año se obtiene un 100 % de curación y durante el seguimiento serológico el paciente negativiza en un año posterior al tratamiento, el tiempo de negativización aumenta conforme el paciente presenta mayor edad (49).

Altech y cols. utilizaron anticuerpos anti F2/3 como marcador de curación en niños con infección congénita por *T. cruzi*. La fracción antigénica F2/3 de tripomastigotes contiene epitopos detectables por anticuerpos representativos de infección activa. Después del tratamiento con Benznidazol, compararon la cinética de negativización de la serología convencional y de los anticuerpos anti F2/3 en pacientes con enfermedad de Chagas congénita. El criterio actual de curación es la negativización postratamiento de la serología convencional, esto significa que el individuo tratado no posee parásitos ni restos antigénicos que estimulen el sistema inmune. El momento en que se negativiza la serología

convencional está relacionado directamente con el tiempo de evolución de la infección previa al tratamiento. Los niños en la fase aguda (vectorial o transplacentaria), negativizan la serología convencional entre los 2 y 12 meses postratamiento, especialmente en la infección congénita. Los resultados que obtuvieron demostraron que la negativización de los anticuerpos anti-F2/3 son un marcador temprano de curación, particularmente en aquellas personas que tienen mayor tiempo de infección (50).

I.- Tamizaje neonatal

El tamizaje neonatal se define como un procedimiento que se realiza para descubrir en recién nacidos aparentemente sanos, patologías que pueden ocasionar daños graves e irreversibles o muerte prematura (51).

Los criterios para que una patología sea considerada a ser evaluada en el tamizaje neonatal son:

- a. La enfermedad deber ser un importante problema a la salud cuya historia natural, incluyendo su desarrollo de latente a enfermedad declarada, sea suficientemente comprendido.
- b. Debe existir una prueba de laboratorio disponible, exacta y sensible para su diagnóstico.
- c. Debe existir tratamiento para la administración a personas diagnosticadas con la enfermedad.
- d. El costo de un caso encontrado (incluyendo su diagnóstico y tratamiento) debe ser económicamente equilibrado en relación al gasto de una atención médica completa (52).

Los programas de tamizaje neonatal constituyen una prioridad dentro de la atención en problemas de salud pública en varios países, ya que, desde hace más de cuatro décadas, el tamizaje ha demostrado ser un procedimiento eficaz para el diagnóstico de errores metabólicos innatos en un gran número de países desarrollados. Otra de las utilidades del tamizaje neonatal es detectar enfermedades infecciosas como toxoplasmosis congénita, enfermedad de Chagas, citomegalovirus y rubéola.

En el 2004, en Brasil, Camargo y cols. estimaron la prevalencia de enfermedades infecciosas congénitas mediante una muestra de sangre de recién nacido recolectada en

papel filtro Schleicher & Schuell® 903 (S&S® 903) el día 3 y 20 de vida, determinando anticuerpos IgM contra *Toxoplasma gondii* y citomegalovirus, así como anticuerpos IgG contra el virus de la rubéola y *T. cruzi* por un método ELISA adaptado para su uso con muestra de sangre seca en papel filtro. Las muestras que resultaron positivas se volvieron a analizar para anticuerpos IgM e IgG en suero de recién nacidos y madres. Se determinó anticuerpos IgM contra *T. gondii* de 364,130 muestras de neonatos, anticuerpos IgM contra citomegalovirus, anticuerpos IgM contra rubéola y anticuerpos IgG contra *T. cruzi* de una misma población de 15,873 recién nacidos. Un total de 195 recién nacidos fueron diagnosticados con toxoplasmosis congénita, 16 con citomegalovirus y 11 con rubéola congénita. Un recién nacido se confirmó para la enfermedad de Chagas y 21 madres fueron positivas para la presencia de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* en suero, en ambos casos por inmunofluorescencia indirecta (53).

En otro estudio realizado por Palacios y cols. en Somoto, Nicaragua, se detectó la presencia de anticuerpos totales contra *T. cruzi*, en muestras de sangre recolectadas en papel filtro (Whatman® No. 1) mediante un ELISA indirecto e IFI. Los sueros respectivos fueron analizados por ELISA a diluciones dobles desde 1:200 hasta 1:1 600 y los eluidos a diluciones dobles desde 1:5 hasta 1:40. Cada muestra de suero y eluido de sangre fue estudiada por duplicado por ELISA y el resultado se expresó como la absorbancia media de ambas determinaciones. Además, se demostró que la prueba de ELISA proporcionó una sensibilidad de 100% y una especificidad de 97,6% respecto a la IFI (54).

Estos resultados sugieren que las enfermedades infecciosas deben ser consideradas para su inclusión en futuros programas de tamizaje neonatal de enfermedades metabólicas.

J.- Situación actual del tamizaje neonatal

En todos los países desarrollados se han implementado programas de tamizaje neonatal que son parte rutinaria de atención a los recién nacidos, pero su realización se enfrenta con grandes obstáculos en América Latina, Asia y África (55).

En México en 1986 se inició un programa para la detección de hipotiroidismo congénito, desde su inicio hasta 1998 se tamizaron 1,547,009 recién nacidos, estableciéndose una frecuencia de 1:2,500 (56).

En Guatemala se desarrolló el programa de tamizaje neonatal para hipotiroidismo congénito desde 1991. En 1999 se detectaron con el programa 23 neonatos con hipotiroidismo congénito estableciéndose una incidencia de 1:1,350 para la ciudad Capital, Sacatepéquez y Amatitlán. En el 2003, se determinó una incidencia para hipotiroidismo congénito de 1:1666 a nivel nacional abarcando todos los nacimientos de los hospitales nacionales y centros de salud del país (55).

En ese año se realizó una capacitación al personal de salud que trabaja en la mayoría de áreas de salud pública del país (exceptuando Alta Verapaz y Retalhuleu); y en los hospitales San Juan de Dios y Roosevelt, para la toma y manejo de muestras de recién nacidos que se le incluyeron dentro del tamiz para hipotiroidismo congénito con una cobertura a nivel nacional de un 7% (57).

Actualmente, el tamizaje se realiza a recién nacidos en el hospital San Juan de Dios, hospital Roosevelt y hospitales privados el país para el diagnóstico de enfermedades metabólicas, sin embargo no se incluye a enfermedades infecciosas en el tamizaje.

K.- Variantes del tamizaje neonatal

1. -Papel filtro

Los programas de tamizaje neonatal de enfermedades congénitas e infecciosas comparten la característica de que los analitos o el analito de interés son determinados en sangre seca colectada en papel de filtro. Este es un método simple y confiable para adquirir y transportar las muestras, dentro de las ventajas que ofrece este método están:

- a. No es necesario un adiestramiento especial para la toma de muestras, la cual se hace por punción del talón, lóbulo de la oreja con una lanceta o de la mano con una aguja.
- b. No hay que centrifugar ni refrigerar las muestras.
- c. El transporte se facilita al no haber peligro de derrame del material biológico muestreado y las muestras pueden enviarse por correo.

Sin embargo, el tiempo entre la toma de la muestra y la realización de la prueba en el laboratorio, provoca que las muestras de sangre queden expuestas al calor y la humedad, parámetros que pueden afectar los resultados de la prueba. Para secar la muestra sobre el papel filtro se recomienda no exponerla al sol ni calentarla, porque la temperatura alta

desnaturaliza las proteínas y las fija al papel y esta puede ser la causa de que las muestras no eluyan (58).

Para el almacenamiento y transporte, las muestras no deben ser empacadas en bolsas de plástico herméticas ya que favorece el aumento de temperatura y humedad que afecta los resultados por desnaturalizar las proteínas. Para el tratamiento de humedad a las muestras se les agrega desecante (silica gel) y normalmente se transportan y almacenan en sobres de papel kraft o manila (59).

En la selección del papel de filtro se debe considerar, la disponibilidad de un papel de calidad estándar que debe ajustarse a los procedimientos de toma de muestra estandarizados en cada país. Además debe poseer una propiedad importante, que sus características funcionales estén dentro de los límites de aceptación para los ensayos destinados a la cuantificación de determinadas sustancias en fluidos biológicos colectados en papel de filtro (60).

Durante más de tres décadas, el papel filtro Schleicher & Schuell 903 ha sido utilizado para la recolección de muestras de sangre para el tamizaje neonatal. Algunas de sus características es ser elaborado con algodón 100% puro y libre de aditivos, lo que garantiza que cada lote de papel posea un tiempo de vida de 12 meses. Está diseñado para la absorción de 1.37-1.71 μ l de sangre en un círculo de diámetro de 1/8 de pulgada y es fabricado de acuerdo al sistema de regulación de calidad de la Administración de alimentos y drogas de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés). Este papel filtro actualmente es producido por la empresa Whatman que adquirió la empresa Schleicher & Schuell, cambiando el nombre comercial del papel filtro a Whatman 903 (61,62).

2.- Agentes bloqueadores y soluciones amortiguadores

El principio para la identificación de proteínas (anticuerpos o enzimas) que se encuentran en la sangre recolectada en el papel filtro, es similar al inmunoblot, procedimiento en el que las proteínas a identificar son transferidas a membranas de nitrocelulosa (en el caso del tamizaje neonatal, el papel filtro), donde se encuentran accesibles para interactuar con otras moléculas que permitan su identificación. Las proteínas quedan unidas a estas membranas de forma no covalente, mediante interacciones

electroestáticas e hidrofóbicas. De esta forma se determina una proteína específica simultáneamente por su antigenicidad y su masa molecular (63).

Después de transferir las proteínas a la membrana, se bloquea la membrana sumergiéndola en un tampón de bloqueo, esta etapa es común en todo procedimiento de inmunodetección y consiste en prevenir la unión no específica del sistema de detección a la membrana. Para obtener resultados significativos, los anticuerpos deben unirse sólo a la proteína de interés y no a la membrana. La unión no específica de anticuerpos puede ser reducida al bloquear los sitios no ocupados de la membrana con una proteína inerte o un detergente no iónico, los agentes más comunes para el bloqueo son albúmina sérica bovina (BSA), leche descremada en polvo y Tween 20 (<0,05% v/v) (Anexo 7) (64).

Estos agentes bloqueadores deben presentar características importantes: inhibir la unión no específica, no presentar reactividad cruzada con componentes del ensayo, actuar como un estabilizador para reducir al mínimo los efectos de la desnaturalización y baja actividad enzimática (65).

El uso de BSA como agente de bloqueo está documentado como un reactivo barato, de almacenamiento sencillo y es el reactivo más utilizado para el bloqueo en inmunoensayos en fase sólida. La leche descremada contiene gran cantidad de carbohidratos complejos y debe descartarse cuando se van a emplear anticuerpos que reconocen determinantes en carbohidratos, además contiene proteínas apolares que se unen a los sitios no ocupados de la membrana logrando aislar los anticuerpos y evitar interferentes en la solución de bloqueo. Si se encuentra demasiado residuo se recomienda el bloqueo con Tween 20. Sin embargo es conveniente usar con cuidado los detergentes no iónicos como Tween 20 pues pueden solubilizar las proteínas (64,65).

El agente bloqueante suele estar disuelto en una solución tampón apropiada, como el amortiguador fosfato salino, este presenta las mejores condiciones debido a que provoca menor grado de hemólisis y variación del pH con la temperatura, lo cual permite que en el rango de 5 a 40 °C su pH se mantenga dentro del rango de variaciones permitidas por el organismo, que cambia de 7,35 a 7,45 (65).

IV. JUSTIFICACIÓN

Guatemala es una región endémica de la enfermedad de Chagas debido a que los vectores que transmiten la enfermedad se encuentran presentes en 21 de los 22 departamentos, lo que hace posible su transmisión en todo el país. Se considera que el área de mayor endemicidad está ubicada principalmente en los departamentos de: Chiquimula, Zacapa, Jalapa, Jutiapa, Santa Rosa, El Progreso, Alta Verapaz, Baja Verapaz, El Quiché y Huehuetenango (16).

La transmisión congénita de la enfermedad de Chagas puede convertirse en un mecanismo de transmisión frecuente en áreas endémicas. La incidencia de la enfermedad de Chagas congénito varía de 2,1 a 28,2 % en Chile, en Argentina de 0,5 a 10,4%, 0,5 a 4,0% en Uruguay y Paraguay 10%, en Bolivia la tasa de transmisión congénita en madres seropositivas en promedio es de 5 a 6%(2).

Estudios realizados en Guatemala en áreas endémicas de la enfermedad de Chagas demuestran una alta seropositividad en embarazadas que pueden transmitir el parásito a su neonato durante su desarrollo o causarle daños irreversibles, incluso la muerte (22).

En 1994 se realizó un estudio en el que se analizaron 600 madres y sus neonatos que asistieron a la maternidad del Hospital Nacional de Chiquimula, determinándoles la presencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en las parejas madre-neonato. Los casos de transmisión congénita fueron 4, donde ambos la madre y el neonato fueron positivos a todas las pruebas serológicas (22).

Si la enfermedad no es diagnosticada oportunamente, el niño puede desarrollar cardiopatía chagásica en los primeros años de vida. Estos estudios han demostrado que la enfermedad es un problema de salud importante en Guatemala por lo que se debe evaluar el riesgo de transmisión por vía transplacentaria (23).

Ante la falta de un plan nacional para evitar la enfermedad de Chagas congénito fue necesario adaptar y evaluar un método para el diagnóstico de Chagas neonatal, así como realizar un estudio piloto de tamizaje neonatal en recién nacidos del área de alta endemia (atendidos en Centros de Salud ubicados en Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa y Hospital Nacional de Zacapa) para demostrar la importancia de implementar esta prueba en los exámenes de rutina en departamentos endémicos, lo que permitirá el diagnóstico oportuno de madre e hijo.

V. OBJETIVOS

A. General

Adaptar un método inmunoenzimático que determine anticuerpos IgG contra *T. cruzi* para ser utilizado en el tamizaje neonatal de la enfermedad de Chagas congénita.

B. Específicos

1. Realizar un plan piloto de tamizaje neonatal para el diagnóstico de enfermedad de Chagas en 4 departamentos del área endémica (Jutiapa, Zacapa, Santa Rosa y Jalapa) de la República de Guatemala.
2. Detectar la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en neonatos en 4 departamentos del área endémica de la República de Guatemala.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

A.- Universo y muestra

1. Universo: Neonatos en 4 centros de atención de salud del área de mayor endemia para la enfermedad de Chagas de la República de Guatemala
2. Muestra: 500 neonatos atendidos en Centros de Salud de los departamentos de Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa y Hospital Nacional de Zacapa.

B.- Recursos

1. Humanos:

a. Asesoras:

Q.B. MSc. Vivian Matta de García

Licda. Karla Lange

b. Integrantes del Seminario de Investigación:

Br. Claudia Fabiola Estrada González

Br. Jorge Alberto Rodas Cruz

2. Institucionales:

- a. Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
- b. Unidad de Inmunodiagnóstico, Laboratorio Microbiológico de Referencia –LAMIR- Departamento de Citohistología
- c. Centro de Salud del municipio de San Pedro Pinula, departamento de Jalapa
- d. Centro de Salud del municipio de Cuilapa, departamento de Santa Rosa
- e. Centro de Salud del municipio de Conguaco, departamento de Jutiapa
- f. Hospital Nacional de Zacapa

3. Físicos:

a. Materiales:

- Guantes de látex.
- Lancetas
- Beaker.
- Papel filtro Schleicher & Schuell 903
- Pipetas automáticas de volumen variable 10 - 100 μ l y de 200 μ l - 1000 μ l.

- Puntas de pipeta desechables.
- Liga de hule.
- Agujas Vacutainer®.
- Camisa para Vacutainer®.
- Tubos de ensayo de 5 cc al vacío
- Placas de 96 micropozos de fondo plano.
- Papel mayordomo.
- Algodón.
- Alcohol.
- Papeletas de recolección de datos
- Sobre papel manila
- Hojas de consentimiento.
- Marcador indeleble negro.
- Encuestas para pacientes con resultado positivo.
- Perforador de hojas de 1/8 y 1/16 pulg.
- Desecante.
- Tijeras.
- Cronómetro.
- Tubos cónicos de 40 mL
- Agitador magnético.
- Tubos capilares con heparina.

b. Equipo

- Refrigeradora.
- Rotador.
- Incubadora de temperatura ambiente.
- Incubadora de temperatura 37°C.
- Potenciómetro.
- Lector de placas de ELISA.
- Centrifugadora.
- Vortex.

c. Reactivos:

- Kit ImmunoComb[®] II Chagas Ab.
- Kit Inmunoensayo enzimático (EIA) para la detección de anticuerpos IgG contra *Trypanosoma cruzi* en suero humano (Omega Pathozyme[®] Merck)
- Amortiguador fosfato salino con Tween 20 (PBS-T), 10mM a pH 7.2.
- Amortiguador fosfato salino + gelatina (0.1%).
- Amortiguador fosfato salino + leche descremada (0.1%).
- Amortiguador fosfato salino + seroalbúmina bovina (1%).

C.- Metodología

Esta investigación consistió en tres etapas:

- i. Adaptación del método serológico: consistió en adaptar dos métodos inmunoenzimáticos una prueba rápida en fase sólida indirecta cualitativa (ImmunoComb[®] II Chagas Ab) para la detección de anticuerpos totales contra *T. cruzi* y uno en placa (Pathozyme[®] Chagas) para detección de anticuerpos cuantitativa IgG contra *T. cruzi* en suero humano.
Ambos ensayos inmunoenzimáticos se adaptaron para detectar anticuerpos contra *T. cruzi* a partir de sangre completa en papel filtro, para esto se consideró el diámetro del papel filtro (3 y 6 mm.), tiempo de elución (1, 18 y 24 horas) y el amortiguador de elución (fosfato salino con Tween 20, con gelatina 0.1%, con leche descremada 0.1%, con seroalbúmina bovina 1% y el diluyente del kit).
- ii. Evaluación de la adaptación del método: Posterior a la adaptación del método se evaluó la condición óptima en la que se obtuvo los mejores resultados, para esto se incluyeron 50 sueros de personas diagnosticadas con la enfermedad de Chagas como controles positivos, mezclándolos con eritrocitos hasta obtener un hematocrito del 55% similar al presentado en los recién nacidos. Se impregnó 50 µl de estos controles en papel filtro. Las muestras se analizaron por los métodos inmunoenzimáticos Omega Pathozyme[®] e ImmunoComb[®] II Chagas Ab previamente adaptados. Se utilizó el mismo procedimiento con 50 personas seronegativas para la enfermedad de Chagas como controles negativos. Los datos obtenidos se analizaron para obtener la sensibilidad y especificidad.

- iii. Aplicación del método adaptado: se realizó un estudio piloto en tres Centros de Salud y un Hospital Nacional del área endémica de Guatemala (Jutiapa, Santa Rosa, Jalapa y Zacapa). Se solicitó el apoyo del director de área de salud del departamento y del centro de salud, así como al Hospital Nacional. A cada entidad de salud se informó el objetivo de la investigación y el procedimiento que se realizó para la toma y análisis de muestra, confirmación y reporte de resultados.

1. Adaptación del método serológico

a. Elaboración de controles internos recolectados en papel filtro

Se elaboraron controles de calidad internos de la siguiente manera:

I. Lavado eritrocitos:

- i.- Se utilizó sangre O Rh positivo y se verificó que tuviera un resultado negativo para la enfermedad de Chagas.
- ii.- Se mezcló 20 ml. de sangre O Rh positivo con 20 ml. de solución salina (1:1) en tubos cónicos.
- iii.- Posteriormente se centrifugó 5 minutos a 5000 rpm. y se descartó el sobrenadante.
- iv.- Se agregó solución salina en la misma proporción, centrifugando 10 minutos y descartando el sobrenadante. Se repitió dos veces más este procedimiento.
- v.- Todos los eritrocitos lavados se agregaron a un solo tubo cónico, se mezcló con agitador magnético por 20 minutos, y se realizó la determinación del hematocrito, el cual debía ser $\geq 90\%$.
- vi.- Al no obtener este porcentaje de hematocrito se centrifugó por 10 minutos, removiendo la solución salina residual, mezclando con agitador magnético por 20 minutos y determinando el hematocrito ($\geq 90\%$).
- vii.- Se almacenó los eritrocitos a temperatura ambiente por 24 horas.

II. Preparación de controles internos de sangre completa con hematocrito de 55%

- i.- Se mezcló la sangre preparada en el inciso I. por 30 minutos con agitador magnético.

- ii.- Si los eritrocitos fueron almacenados la noche anterior se realizó 6 determinaciones adicionales del hematocrito.
 - iii.- Se calculó el volumen necesario de suero positivo con anticuerpos IgG contra *T. cruzi* según la siguiente fórmula $C_1V_1=C_2V_2$ para elaborar 20 ml. de los controles de calidad internos y calibrador, donde C_1 = concentración de hematocrito de 90% en sangre completa, V_1 = volumen de eritrocitos, C_2 = concentración de hematocrito de 55% en sangre completa y V_2 = volumen final (eritrocitos + suero).
 - iv.- Se adicionó el volumen de suero necesario utilizando según sea el caso sueros negativos para anticuerpos IgG para la enfermedad de Chagas (control negativo) y suero positivo para anticuerpos IgG para la enfermedad de Chagas (control positivo y control positivo bajo).
- b. Evaluación de variables con el método serológico utilizando los controles internos
- Se evaluó dos métodos inmunoenzimáticos: InmunoComb[®] II Chagas Ab y Omega Pathozyme[®] Merck para el tamizaje neonatal de la enfermedad de Chagas utilizando los controles internos descritos anteriormente. Cada calibrador se combinó con diferentes diámetros de muestra, tiempos de elución y amortiguadores de elución (Anexo 8) de la siguiente manera:
- i.- Se colocó 50 µl del calibrador interno sobre papel filtro Schleicher & Schuell 903.
 - ii.- Se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas en obscuridad.
 - iii.- Se perforó 25 discos de la muestra depositada en el papel filtro de un diámetro de 6 mm. y otros 25 discos de 3 mm con el perforador de hojas.
 - iv.- Se colocó un juego de discos de cada diámetro en pozos individuales y se añadió a cada uno 100µl de amortiguador fosfato salino con Tween 20 (PBS-T) por quintuplicado.
 - v.- Se repitió el inciso iv con los siguientes amortiguadores de elución: amortiguador fosfato salino con leche descremada, amortiguador fosfato salino con gelatina y amortiguador fosfato salino con seroalbúmina bovina (Anexo 8).

El último juego de discos se analizó directamente en la prueba de ELISA, utilizando como eluyente el diluyente del kit.

- vi.- Se incubó cada juego de discos con el amortiguador de elución por 18 horas a temperatura ambiente.
- vii.- Se repitió los incisos i al v y se colocó cada juego de discos con el amortiguador de elución incubando por 24 horas a temperatura ambiente.
- viii.- Con el diluyente de kit se colocó el juego de discos en incubación por una hora a temperatura ambiente.
- ix.- Análisis estadístico: Se utilizó la metodología ensayo y error para obtener las condiciones óptimas para la adaptación del método, en la cual se realizó 5 repeticiones de cada variable (tiempo de incubación, diámetro papel filtro, eluyentes) para los dos ensayos inmunoenzimáticos.

I. Determinación de anticuerpos IgG contra *T. cruzi* con el kit Omega Pathozyme[®] Merck

Se determinaron cuantitativamente anticuerpos IgG contra *T. cruzi* de los controles por el método de Inmunoensayo Enzimático (EIA) (Omega Pathozyme[®] Merck) de la siguiente manera:

- i.- Se llevó todos los componentes del kit a temperatura ambiente.
- ii.- Se diluyó 1:25 los eluidos control (20µl muestra y 480µl diluyente).
- iii.- Se realizó un mapa identificando los pozos a utilizar con el eluido respectivo.
- iv.- Se sirvió 100µl de los eluidos diluidos y los controles del test dentro de los pozos.
- v.- Se mezcló por 5 segundos, cubriendo la microplaca e incubando a 37° C por 60 minutos en cámara húmeda.
- vi.- Se descartó el contenido de los pozos dentro de un contenedor de desechos biológicos.
- vii.- Se agregó 300µl de la solución de lavado en cada pozo y se descartó, este procedimiento se repitió 3 veces.
- viii.- Se removió los residuos de la solución de lavado golpeando la placa contra papel adsorbente.

- ix.- Se dispensó 100µl de conjugado en cada pozo, mezclando por 5 segundos, incubando a 37° C por 30 minutos en cámara húmeda.
- x.- Se descartó el contenido de los pozos dentro de un contenedor de desechos biológicos y posteriormente se lavó con solución de lavado 3 veces.
- xi.- Se dispensó 100µl de la solución de sustrato en cada pozo, mezclando por 5 segundos e incubando en oscuridad a 37° C durante 15 minutos en cámara húmeda.
- xii.- Se agregó 100µl de solución de parada en cada pozo, mezclando por 30 segundos y se observó el cambio de color azul a color amarillo.
- xiii.- Se procedió a leer la densidad óptica (OD) con un filtro dual de 450 - 630 nm.
- xiv.- Se calculó el valor de corte por medio de la siguiente fórmula: OD de control Positivo Bajo/1.5
- xv.- Se consideró como:
 - Positivo: cuando la absorbancia de la muestra fue mayor que el valor de corte.
 - Negativo: cuando la absorbancia de la muestra fue menor que el valor de corte.
 - Indefinido: cuando la absorbancia de la muestra fue menor que la absorbancia del control positivo bajo, pero mayor que la absorbancia del control negativo. Si el resultado fue dudoso se repitió el procedimiento.

II. Determinación de anticuerpos totales contra *T. cruzi*. con el kit InmunoComb[®] II Chagas Ab

Con el kit InmunoComb[®] II Chagas Ab se realizó la determinación según el siguiente procedimiento:

- i.- Todos los reactivos y eluidos se llevaron a temperatura ambiente (18-26 ° C) y se agitaron suavemente.
- ii.- La bandeja de desarrollo se incubó a 37 °C durante 20 minutos.
- iii.- Se cubrió la mesa de trabajo con papel absorbente y se mezcló los reactivos agitando la bandeja de desarrollo.
- iv.- Posteriormente se removió la cubierta de aluminio de la bandeja de desarrollo utilizando el perforador que incluye el kit.

- v.- Se removió el empaque de aluminio del peine y se retiró el peine, se cortaron el número de sitios de reacción (dientes) a utilizar.
- vi.- Se extrajo 10µl de eluido y se colocó en uno de los pocillos de la fila A de la bandeja de desarrollo y se mezcló.
- vii.- Se repitió el paso anterior para los otros eluidos incluyendo un control positivo y un control negativo.
- viii.- Se insertó y retiró el peine dentro de los pocillos de la fila A repetidamente.
- ix.- Se dejó el peine en la fila A durante 10 minutos y mezcló dos veces, luego se eliminó la cubierta de aluminio de la fila B.
- x.- Se cambió el peine de la fila A a la fila B (primer lavado) absorbiendo el exceso de líquido de los sitios de reacción del peine con papel absorbente limpio sin tocar la superficie de los sitios de reacción.
- xi.- A continuación se insertó durante 10 segundos el peine en la fila B y se retiró, repitiendo esta acción durante 2 minutos, luego se perforó el papel aluminio de la fila C.
- xii.- Se insertó el peine dentro de los pocillos de la fila C (reacción del conjugado), se incubó el peine por 10 minutos, mezclando algunas veces, se perforó el papel aluminio de la fila D, seguidamente se retiró el peine, eliminando el exceso de líquido con papel absorbente.
- xiii.- Se insertó durante 10 segundos el peine en la fila D (segundo lavado) y se retiró, se repitió esta acción durante 2 minutos, posteriormente se perforó el papel aluminio de la fila E.
- xiv.- Se insertó durante 10 segundos el peine en la fila E (tercer lavado) y se retiró, repitiendo esta acción durante 2 minutos, luego se perforó el papel aluminio de la fila F.
- xv.- Se insertó el peine en la fila F (reacción de color), incubando el peine por 10 minutos y mezclando algunas veces, se retiró el peine al finalizar los 10 minutos.
- xvi.- Se insertó el peine nuevamente en la fila E (reacción final), al cabo de 1 minuto, se retiró y se dejó secar al aire.

- xvii.- Se desechó las bandejas de desarrollo, puntas descartables, papel absorbente y guantes como peligro biológico.
- xviii.- La coloración de un punto superior (control interno del kit) en el diente del peine indicó que el eluido no es reactivo a los anticuerpos contra *T. cruzi*.
- xix.- La coloración de dos puntos en el diente del peine indicó la presencia de anticuerpos contra *T. cruzi*.

2.- Evaluación del método serológico adaptado a muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro

Para la evaluación del método con las condiciones óptimas obtenidas en la adaptación, se incluyeron a 50 sueros de personas diagnosticadas con la enfermedad de Chagas como controles positivos. Para ello a los sueros positivos se agregó eritrocitos siguiendo la metodología utilizada en la adaptación del método serológico para obtener un escenario similar al de los neonatos con un hematocrito del 55%. Estos controles se recolectaron en papel filtro. Las muestras se analizaron por el método de ELISA Omega Pathozyme[®] adaptado. Se utilizó el mismo procedimiento con 50 personas sanas que no presentaron la enfermedad de Chagas como controles negativos.

Los datos obtenidos se analizaron en tablas de contingencia de 2X2 en el programa Epidat 3.1 y se obtuvo los índices estadísticos como: sensibilidad y especificidad.

3.- Aplicación del método serológico adaptado a muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro en 4 departamentos del área endémica

Se solicitó apoyo de los centros de salud de 3 departamentos (Jalapa, Jutiapa y Santa Rosa) por medio de una carta dirigida al director de área de salud de cada departamento donde se informó el objetivo de la investigación. Este procedimiento se llevó a cabo en cada centro de salud. En el caso del departamento de Zacapa se realizó el mismo procedimiento con atención al director del Hospital Nacional. Además, se capacitó al personal de salud (médicos y personal de enfermería) para la toma de muestra en papel filtro la cual se realizó por el siguiente procedimiento:

a. Toma de muestra:

- i.- Se incluyó a todos los neonatos y niños menores de 3 meses atendidos en las entidades de salud de los 4 departamentos.
- ii.- Se obtuvo la autorización para participar en el estudio por medio de un consentimiento aceptando tomar parte en el estudio “Tamizaje Neonatal de la Enfermedad de Chagas en la República de Guatemala, Adaptación y Evaluación de un método serológico” (Anexo 9).
- iii.- Se llenó el formulario de la tarjeta de papel filtro con la información general de la madre y el recién nacido (Anexo 10).
- iv.- Se inmovilizó la mano del recién nacido.
- v.- Se localizó la vena, se limpió el área con alcohol y dejó evaporar el exceso.
- vi.- Se introdujo la aguja y se dejó caer gota por gota en papel filtro, la gota de sangre debía tener características como ser de gran tamaño de manera que llenara el círculo completo y que impregnara la cara posterior de la tarjeta de papel filtro.
- vii.- Se puso la superficie del papel filtro en contacto con la gota de sangre hasta llenar los círculos de la tarjeta.
- viii.- Se revisó si la muestra de sangre colectada en papel filtro es válida o no (Anexo 11).
- ix.- Al terminar la toma de la muestra se presionó el área de la punción con un algodón limpio y seco.
- x.- Se dejó secar la muestra en papel filtro a temperatura ambiente en posición horizontal.
- xi.- Se guardó la muestra en papel filtro con la ficha de identificación en un sobre y se almacenó dentro de un sobre manila con desecante (silica gel), hasta que fue analizada en el laboratorio.

b. Análisis de la muestra

El análisis de las muestras de sangre en papel filtro se realizó según las condiciones óptimas ya establecidas en la adaptación del método inmunoenzimático siguiendo el mismo procedimiento planteado anteriormente.

c. Confirmación de Resultados

Las muestras con resultado positivo se confirmaron con el mismo método previo al reporte de resultados. Para la confirmación de casos, se citó a la madre y recién nacido en la entidad de salud donde fue atendido, para la recolección de una muestra de sangre venosa de la madre y del recién nacido. En el caso de un resultado negativo por microconcentración se cito al niño a los 3, 6 y 9 meses para evaluar presencia y título de anticuerpos.

d. Reporte de resultados

- i.- Tamizaje neonatal: Se reportó vía correo tradicional y electrónico a la dirección de la entidad de salud respectivo 4 días hábiles después de recibidas las muestras.
- ii.- Muestras confirmatorias (madre y neonato): Al obtener un resultado positivo confirmado se remitió al médico especialista (internista ó pediatra).
- iii.- Informe mensual: Se realizó un informe mensual y un informe final del estudio al director del centro de salud, director de área y director del hospital.

e. Análisis estadístico

Los resultados provenientes de las encuestas y pruebas serológicas se tabularon de forma correlacionada.

- I. Tipo de estudio: prospectivo y transversal.
- II. Selección de muestra: Al no existir datos de prevalencia de la enfermedad de Chagas congénito en el país y por limitaciones económicas, se incluyó por conveniencia 500 neonatos.
- III. Codificación: A cada participante se le asignó un código de identificación, el cual consistía en una letra vocal que fue específica por departamento y un número correlativo al ingreso del estudio. El número se indicó en la hoja de identificación de la muestra.
- IV. Resultados: Los resultados de la encuesta indicaron la exposición y frecuencia de los factores de riesgo, además de indicar posible

sintomatología de los pacientes positivos. La prueba serológica indicó la presencia o ausencia de anticuerpos anti *T. cruzi* en la madre y posiblemente en el recién nacido.

- V. Análisis de datos: se elaboró una base de datos y se realizó el análisis de estadística descriptiva en Epidat 3.1 de la información recolectada durante la toma de muestra de sangre, como datos generales, datos del embarazo y parto (semanas de embarazo, sexo del recién nacido, tipo de parto, peso al nacer), datos epidemiológicos (transfusiones sanguínea, tipo de material de construcción de la vivienda, conocimiento del vector) y el resultado de la prueba serológica. El análisis de estadística descriptiva se presentó en forma de frecuencias absolutas y porcentajes. Para evaluar la existencia de relación estadística se realizó un análisis por medio de Chi cuadrado entre las variables recolectadas y la positividad a la enfermedad de Chagas con el programa Epidat 3.1.
- VI. Entrega de Resultados: A cada paciente se le hizo entrega de los resultados obtenidos de su prueba serológica, incluyendo recomendaciones a seguir. En los casos con resultado positivo se remitieron al pediatra o internista del Hospital Departamental para su seguimiento.

VII. RESULTADOS

1. Adaptación de dos métodos inmunoenzimáticos serológicos a muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro

Dos métodos inmunoenzimáticos comerciales fueron empleados para el estudio: un ensayo cualitativo en fase sólida (ImmunoComb[®] II Chagas Ab) para la detección de anticuerpos totales y un ensayo en placa (Pathozyme[®] Chagas) para detección de anticuerpos IgG contra *T. cruzi*, ambos ensayos están estandarizados para muestras de suero y plasma.

Estos métodos inmunoenzimáticos fueron adaptados para su uso con muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro. Fueron analizadas diferentes variables en el proceso de elución del papel filtro: diámetro del papel (3 y 6 mm.) y 5 diferentes soluciones eluyentes con su respectivo agente bloqueador y diferentes tiempos de elución (1, 18 y 24 horas).

Para la elución de anticuerpos en muestras de sangre completa en papel filtro se utilizó la metodología de ensayo y error, en la cual se determinó la combinación de las variables. Para el kit ImmunoComb[®] II Chagas Ab la mejor combinación de variables que se obtuvo fue: diámetro de 6 mm de muestra, diluyente del kit y tiempo de elución de 1 hora, la cual se realizó directamente en la bandeja de desarrollo. Con el método inmunoenzimático en placa la combinación más adecuada fue: diámetro de muestra de 6 mm, elución con 241 µl de diluyente del kit (para una dilución 1:25) y tiempo de elución de 1 hora. Esta no se realizó directamente en los pozos de reacción sino en una placa para ensayo de fondo plano a temperatura ambiente.

2. Evaluación de los 2 métodos de inmunoenzimáticos con la combinación óptima de variables

Los controles preparados con eritrocitos fueron analizados con ambos métodos inmunoenzimáticos. Los resultados fueron comparados y analizados en tablas de contingencia, los resultados se observan en la tabla 1. El método Omega Pathozyme[®] presentó 5 falsos positivos e ImmunoComb II[®] Chagas Ab solamente uno. No se obtuvo ningún resultado falso negativo.

Tabla 1. Resultado comparativo de anticuerpos Anti- *T. cruzi* en suero y muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro utilizando los métodos inmunoenzimáticos Omega Pathozyme[®] e ImmunoComb II[®] Chagas Ab

Papel Filtro	Serología			
	Omega Pathozyme [®]		ImmunoComb [®] II Chagas Ab	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivo	45	0	49	0
Negativo	5	50	1	50
Total	50	50	50	50

Fuente: Datos experimentales

En la tabla 2 se presentan los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos para ambos métodos. El ensayo ImmunoComb[®] II Chagas Ab presentó una mayor sensibilidad. La especificidad en ambos métodos fue de 100%.

El análisis costo-beneficio revela que el costo por prueba en el ensayo Omega Pathozyme[®] es de Q 7.52 y el ImmunoComb[®] II Chagas Ab es de Q 36.84. Para el análisis de las muestras del plan piloto se decidió emplear el ensayo ELISA Omega Pathozyme[®] por las siguientes características: bajo costo por prueba, método semicuantitativo que permite realizar el seguimiento de hijos de madres positivas y evaluar la disminución de la concentración de los anticuerpos maternos contra *T. cruzi* a los 3, 6 y 9 meses.

Tabla 2. Evaluación estadística de dos ensayos inmunoenzimáticos adaptados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Parámetro	Omega Pathozyme [®]		ImmunoComb [®] II Chagas Ab	
	%	*IC _{95%}	%	*IC _{95%}
Sensibilidad	90.00	80.68 - 99.32%	98.00	93.00 – 100.00 %
Especificidad	100.00	99.00 – 100.00%	100.00	99.00 – 100.00 %

*Intervalo de Confianza

Fuente: Datos experimentales

3. Aplicación del método inmunoenzimático adaptado: Estudio Piloto en 4 departamentos de endémicos de Guatemala.

El muestreo se realizó en el Centro de Salud del municipio de Cuilapa del departamento de Santa Rosa; Centro de Salud y la Cooperativa “El Recuerdo” en el municipio de San Pedro Pinula del departamento de Jalapa; Centro de Salud del municipio de Conguaco del departamento de Jutiapa y Hospital Nacional en el departamento de Zacapa.

Se obtuvo un total de 500 muestras recolectadas en los cuatro departamentos. En la tabla 3 se detalla el número de muestras analizadas por departamento. Fueron procesadas 455 (91 %) muestras ya que 45 (9 %) no fueron adecuadas para el análisis. Se obtuvo 439 (96.48 %) con resultado negativo, 12 (2.64 %) con resultado positivo y 4 (0.88 %) con resultado indeterminado.

Tabla 3. Resultados de análisis de muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro de plan piloto “Tamizaje Neonatal de la Enfermedad de Chagas” realizado en 4 Centros de Atención de Salud del área endémica de Guatemala.

Departamento	Resultado			Total (%)
	Positivo	Negativo	Indeterminado	
Santa Rosa	1	125	1	127 (27.91 %)
Jalapa	7	90	0	97 (21.32 %)
Jutiapa	2	79	2	83 (18.24 %)
Zacapa	2	145	1	148 (32.53 %)
Total	12 (2.64 %)	439 (96.48 %)	4 (0.88 %)	455 (100 %)

Fuente: Datos experimentales

Los resultados positivos e indeterminados fueron confirmados con una muestra sérica de madre e hijo. No fue posible localizar a todos los casos para confirmar.

Las muestras provenientes de los departamentos de Jalapa y Jutiapa fueron confirmadas. Los resultados obtenidos en la confirmación se presentan en la tabla 4. Se logró confirmar como positivas las nueve muestras que habían presentado un resultado positivo tanto a madre como hijo. En el caso de las muestras que presentaron resultado indeterminado, un caso procedente de Santa Rosa se confirmó en madre e hijo como

negativa, una muestra procedente de Jutiapa correspondía a un gemelo, cuyo hermano presentó un resultado negativo, por lo que se solicitó muestra sérica de ambos para confirmación, obteniendo un resultado positivo en las dos muestras séricas así como de la muestra sérica de la madre. Una muestra procedente de Santa Rosa con resultado negativo se confirmó como positivo en madre e hijo.

En total, 13 muestras fueron positivas, que representan un porcentaje del 2.86 %.

Tabla 4. Distribución de resultados de confirmación sérica de muestras en papel filtro de estudio piloto “Tamizaje Neonatal de la Enfermedad de Chagas” realizado en 4 Centros de Atención de Salud del área endémica de Guatemala.

Resultados de confirmación	Departamento			Total
	Jalapa	Jutiapa	Santa Rosa	
Muestras positivas en papel filtro confirmadas en suero con resultado positivo	7	2	0	9
Muestras indeterminadas en papel filtro confirmadas con resultado positivo	0	2	0	2
Muestras negativas en papel filtro confirmadas con resultado positivo	0	1	1	2
Total de muestras positivas	7	5	1	13

Fuente: Datos experimentales

En la tabla 5 se presenta la información epidemiológica recolectada de 451 neonatos. No se incluyeron 3 muestras con resultado positivo y una con resultado indeterminado en papel filtro que no fueron confirmadas en suero. Uno de los inconvenientes que se encontró fue que la información personal no fue debidamente recolectada en la ficha y esto se reflejó por ausencia de datos.

La muestra del estudio estuvo conformada por neonatos y niños menores de 3 meses de ambos sexos, correspondiendo 142 (44.65 %) al sexo femenino, 176 (55.35 %) de sexo masculino.

En relación a manifestaciones clínicas propias de la infección congénita, 34 (11.93 %) presentaron bajo peso al nacer (menor de 5.5 libras), 251 (88.07 %) presentaron un peso normal. En lo referente a la edad gestacional, 99 (36.53 %) nacieron antes de la semana 37 de embarazo lo que se considera como nacimiento pre término y 172 (63.47

%) a término. En el caso de abortos, 56 (14.85 %) indicaron abortos en embarazos anteriores. Al relacionar estas variables con seropositividad, 2 (16.67 %) presentaron bajo peso al nacer, 5 (41.67 %) nacieron pre término y 4 (33.33 %) presentaron abortos previos.

En cuanto a vías de transmisión asociadas a la infección, 10 (2.65 %) refirieron haber recibido alguna transfusión pero no indicaron la fecha respectiva y 58 (15.38 %) indicaron la presencia de la chinche picuda dentro de su vivienda y se obtuvo 2 madres con resultado positivo.

Al evaluar las condiciones de la vivienda, el tipo de material más utilizado en las paredes fue block con 132 (35.01 %) y piso de granito con 147 (39.10 %). Al relacionar las condiciones de vivienda con seropositividad, 6 (50.00 %) refirieron la combinación de adobe y lámina como material de paredes y 9 (75.00 %) presentan piso de tierra.

Para el seguimiento de los hijos de madres seropositivas a *T. cruzi* participaron 12 niños, se programó el seguimiento para 9 meses pero solo se desarrollo durante 6 meses, cuyos resultados se presentan en la tabla 6. Se realizó una prueba parasitológica de microhematocrito, la cual en todos los casos fue negativa. Asimismo, se obtuvo una muestra sérica para determinar el título de anticuerpos basal, obteniéndose un resultado positivo en todos los casos.

En el primer control que se realizó a los 3 meses, 6 (50%) niños presentaron un resultado negativo, 2 (16 %) un resultado positivo con una disminución mayor del 70% de anticuerpos comparado con el nivel basal y 4 (34 %) no se presentaron a la institución de salud para su control. En el segundo control que se realizó a los 6 meses solo participaron 3 (25 %) niños quienes presentaron un resultado negativo. El último control de los 9 meses no se realizó por falta de participación para la toma de muestra. De los 12 hijos de madres seropositivas, solamente a 2 hijos se pudo dar un resultado negativo confirmado para infección congénita, debido a la ausencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en el último control realizado a los 6 meses y 7 meses de edad en la cual no se evidenció producción de anticuerpos contra la infección.

Tabla 5. Información epidemiológica de la población del estudio piloto “Tamizaje Neonatal de la Enfermedad de Chagas” realizado en 4 Centros de Atención de Salud del área endémica de Guatemala.

Variable	Frecuencia *	%	Resultado		P value
			Positivo	Negativo	
Sexo					
Femenino	142	44.65	7	135	0.6922
Masculino	176	55.35	6	170	
Sin datos	133		-		
Peso al nacer					
Menor de 5.5 libras ^{&}	34	11.93	2	32	0.9504
Mayor de 5.5 libras	251	88.07	10	241	
Sin datos	166		1		
Semanas de embarazo					
Pre término (< 37 semanas)	99	36.53	5	94	0.9432
Término (> 37 semanas)	172	63.47	7	165	
Sin datos	180		1		
Abortos					
Si	56	14.85	4	52	0.1565
No	321	85.15	8	313	
Sin datos	74		1		
Transfusión					
Si	10	2.65	2	8	0.0424
No	367	97.35	11	356	
Sin datos	74		-		
Presencia de chinche en vivienda					
Si	58	15.38	2	56	0.6957
No	319	84.62	11	308	
Sin datos	74		-		
Tipo de paredes					
Adobe	66	17.51	1	65	
Bajareque	58	15.38	3	55	
Lámina	19	5.04	1	18	
Madera	15	3.98	-	15	
Block	132	35.01	2	130	
Combinación dos materiales	87	23.08	6**	81	
Sin datos	74		-		
Tipo de piso					
Cemento	107	28.46	4	103	
Tierra	119	31.65	9	110	
Piso	147	39.10	-	147	
Combinación dos materiales	3	0.80	-	3	
Sin datos	75		-		
Animales dentro de la casa					
Si	192	51.34	8	184	0.6408
No	182	48.66	5	177	
Sin datos	77		-		

Fuente: Datos experimentales obtenidos en encuesta

*No se incluyó muestras con resultado indeterminado y positivo en papel filtro que no fueron confirmadas. Muestras por departamento Santa Rosa: 126, Jalapa: 97, Jutiapa: 83, Zacapa: 145

**Los 6 casos positivos indicaron combinación de materiales de paredes de adobe y lámina

[&]Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se considera bajo peso al nacer si es menor de 5.5 lbs

Tabla 6. Seguimiento de niños de madres seropositivas a *T. cruzi* en estudio piloto “Tamizaje Neonatal de la Enfermedad de Chagas” realizado en 4 Centros de Atención de Salud del área endémica de Guatemala.

Código	Edad* (días)	Parasitología		Serología			Interpretación
		Microhematocrito	Basal	3 meses	6 meses	9 meses	
CE9	15	-	+	-	NSP	NSP	NI
CE12	14	-	+	-	NSP	NSP	NI
CE16	17	-	+	+**	NSP	NSP	NI
CE22	22	-	+	NSP	NSP	NSP	NI
CE45	54	-	+	+**	NSP	NSP	NI
CE46	6	-	+	-	NSP	NSP	NI
CS11	16	-	+	NSP	NSP	NSP	NI
CON8	35	-	+	-	-	NSP	Negativo
CON9	35	-	+	-	-	NSP	Negativo
CON10	70	-	+	-	NSP	NSP	NI
CON14	69	-	+	NSP	NSP	NSP	NI
CON31	55	-	+	NSP	-	NSP	NI

Interpretación resultados: - Resultado Negativo + Resultado positivo

* Edad del niño en días en la fecha del tamizaje

** Valores disminuyeron comparados con la basal NSP: No se presentó a la cita programada para su control

NI: Sin interpretación debido a falta de controles séricos

VIII. DISCUSION DE RESULTADOS

1. Adaptación de dos métodos inmunoenzimáticos serológicos a muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro

La utilización de muestras de sangre completa recolectadas en papel filtro ha sido propuesto como una alternativa para la determinación de anticuerpos en recién nacidos, por ser un método simple de recolección, almacenamiento y transporte.

Esta técnica de recolección de muestras ha sido ampliamente usada por años para el tamizaje neonatal en la investigación de enfermedades metabólicas, así como para la detección de enfermedades infecciosas a través de la determinación de anticuerpos eluidos. Diversos autores han utilizado esta técnica como una alternativa para la detección de anticuerpos de enfermedades infecciosas como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), Dengue, Toxoplasmosis, Rubéola, Citomegalovirus y Enfermedad de Chagas, cuando las condiciones no permiten el almacenamiento refrigerado de muestras séricas. Sin embargo, esta técnica al ser aplicada en el tamizaje neonatal requiere confirmación sérica por dos pruebas diagnósticas de diferente principio o por métodos parasitológicos (38, 53, 66-70).

En esta técnica el papel filtro utilizado es de diferentes tipos y marcas como Whatman[®] números 1, 3, y 4 y para el tamizaje neonatal Schleicher & Schuell[®] 903 (S&S[®] 903), el cual actualmente es comercializado como Whatman 903 con los cuales se ha obtenido buenos resultados por el método ELISA (62).

Con el fin de adaptar un método inmunoenzimático que determine anticuerpo IgG contra *T. cruzi* para ser utilizado en el tamizaje neonatal se utilizó papel filtro S&S[®] 903, el cual está estandarizado para la recolección de muestras de sangre completa para el diagnóstico de enfermedades metabólicas en el país (55).

El diámetro analizado fue de 3 y 6 mm, lo que corresponde a 11.25 μ l de suero en 25 μ l de sangre completa y 5.62 μ l de suero en 12.5 μ l de sangre completa. Se encontró los mejores resultados con un diámetro de 6 mm ya que permitió una elución adecuada de anticuerpos para su determinación por los dos métodos inmunoenzimáticos evaluados (70-74).

Los inmunoensayos como ELISA, se basan en la inmovilización de biomoléculas, principalmente proteínas. La capacidad de interacción de proteínas y otras biomoléculas (unión antígeno-anticuerpo) es una característica esencial, sin embargo, debe tomarse en cuenta que la unión no específica de otras proteínas o biomoléculas puede afectar la especificidad y sensibilidad. Esta unión no específica puede ser reducida con un agente bloqueador el cual no participa en la reacción de la prueba por presentar baja actividad enzimática (65, 75).

Se encontró que la mejor solución como eluyente fue el diluyente de cada kit ya que con ellos se obtuvo una buena correlación de los resultados con los controles. En el caso del ELISA Omega Pathozyme[®], se agregó 241 µl de diluyente con cada círculo de 6 mm para obtener una dilución 1:25 requerida por el inserto del kit. Este diluyente está compuesto de amortiguador Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol) que es ampliamente utilizado en bioquímica y biología molecular por su capacidad de inhibir enzimas. El pH de este compuesto es similar al pH fisiológico de los organismos y es de bajo costo, estas características lo hacen uno de los amortiguadores más comunes utilizados en biología. En el caso del ensayo inmunoenzimático ImmunoComb[®] II Chagas Ab no se encontró bibliografía que indicara la composición del diluyente (76).

Con relación al tiempo de elución se ha documentado el uso de 1, 12 y 24 horas, obteniendo similares resultados de elución. En esta investigación se obtuvo con ambos kits una elución óptima en una hora, mientras que a las 18 y 24 horas no se obtuvo resultados satisfactorios probablemente por la degradación del papel filtro causando interferencia con la detección de anticuerpos (67,68,70).

2. Evaluación de los métodos con la combinación óptima de variables

Los resultados muestran la factibilidad en adaptar una muestra sanguínea en papel filtro y su posterior uso en ensayos inmunoenzimáticos. Es importante establecer la sensibilidad y especificidad de cada ensayo ya que en la presente investigación se obtuvo una especificidad del 100.00%, lo que representa que hay una probabilidad exacta y precisa de obtener un resultado negativo de un paciente que no presenta anticuerpos contra *T. cruzi*, estos datos son similares a los obtenidos por Palacios y cols (54).

Con relación a la sensibilidad se obtuvo resultados diferentes en los dos métodos inmunoenzimáticos evaluados ya que el ELISA Omega Pathozyme® obtuvo una sensibilidad del 90.00 %, este valor pudo ser afectado por la elaboración de controles positivos con sangre completa a partir de suero positivo y la disminución de los valores de absorbancia de los controles del kit conforme a la fecha de uso, esta variación afectó tanto los controles del kit como los controles de evaluación. Para las pruebas utilizadas en los procedimientos de tamizaje o screening la sensibilidad debe ser alta para detectar a todos los posibles casos positivos y posteriormente realizar la confirmación con otra prueba de laboratorio de mayor especificidad. Debido al porcentaje de sensibilidad se obtuvo 2 resultados falsos negativos (53).

Se ha documentado reacción cruzada por métodos ELISA con el género *Leishmania* por presentar antígenos similares con *T. cruzi*, en esta investigación no se realizó la evaluación de las reacciones cruzadas debido a la dificultad para obtener sueros positivos para *Leishmania*. Palacios y cols. encontraron una reacción cruzada de 26.6% en pacientes con leishmaniasis visceral (54).

3. Aplicación del método adaptado: Estudio Piloto en 4 departamentos del área endémica.

No hay estudios epidemiológicos recientes de la enfermedad de Chagas por vía de transmisión vertical en el área endémica de Guatemala, por lo que no existen datos acerca de la prevalencia de infección congénita. Debido a ello el tamaño de muestra se estableció por conveniencia en 500 muestras. En el país, principalmente en el área rural, no es habitual que las madres acudan con el neonato a los servicios de salud (hospital, centros de salud y puestos de salud) durante el primer mes de vida. Por esta razón se decidió incluir dentro del tamizaje a niños menores de 3 meses que acuden para consulta o vacunación al servicio de salud.

Del total de muestras recolectadas, 45 (9 %) no se encontraban en condiciones óptimas para el procesamiento debido a muestra insuficiente, coágulos de sangre y ausencia de datos para la identificación de la muestra por lo que fueron descartadas. La principal causa se debió a la metodología utilizada en la punción del dorso de la mano debido a la falta de experiencia del personal de salud, lo que llevó al rechazo de la

muestra. La punción capilar en la parte lateral de las falanges distales de los dedos de la mano por medio de lancetas es recomendada para obtener mejores resultados en la toma de muestras óptimas en papel filtro y se ha documentado que no afecta en los resultados al comparar con los resultados séricos (66-69).

El desarrollo del seguimiento para la confirmación presentó problemas en los departamentos de Santa Rosa y Zacapa, donde se notificó a las autoridades de salud pero no se obtuvo una respuesta de parte de las entidades para citar a las madres e hijos.

Al realizar la confirmación se obtuvo un porcentaje de positividad de 2.86 % (13 casos). La mayoría de casos positivos se presentaron en los municipios de San Pedro Pinula y Conguaco, de los departamentos de Jalapa y Jutiapa respectivamente. La población que participó en la investigación fue principalmente del área rural y que viven en aldeas o caseríos alejados de la entidad de salud. Lo que esta íntimamente relacionado con la Enfermedad de Chagas. Un gran porcentaje de personas procedentes de estos lugares viven en condiciones de extrema pobreza comparadas con las personas de los municipios de Cuilapa y Zacapa (77).

Al evaluar la asociación entre los factores epidemiológicos y la seropositividad no se encontró relación estadísticamente significativa con el sexo del neonato, manifestaciones clínicas de infección congénita como: peso al nacer, semanas de embarazo y abortos ($p > 0.05$). En relación a las vías de transmisión de la infección en la madre, no se obtuvo relación estadísticamente significativa con la presencia del vector dentro de la vivienda ($p = 0.6957$), es importante indicar que la población no conoce a la chinche a pesar de la campañas de educación que se han realizado en algunos departamentos para la identificación y control de *T. dimidiata*. Se presentó relación estadísticamente significativa al evaluar la transfusión sanguínea ($p = 0.0424$); actualmente en el país a todas las unidades de sangre previas a la transfusión se les realiza un tamizaje serológico el cual incluye las pruebas para la detección de virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), virus de Hepatitis C (VHC), antígeno de superficie del virus de Hepatitis B (HBsAg), Sífilis y enfermedad de Chagas según la ley de Servicios de Medicina Transfusional y Bancos de Sangre (Decreto 87-97 del Congreso

de la República). En el caso de los pacientes positivos que informaron haber recibido una transfusión no se conoce la fecha exacta (78).

Al evaluar las condiciones de vivienda, se encontró el uso de materiales en las paredes como adobe y bajareque, los que se han documentado estar asociados con la presencia del vector. En esta investigación, 4 casos positivos utilizan este tipo de materiales en las paredes y 6 casos positivos adobe en combinación con otro material, lo cual es un factor de riesgo para la presencia del vector dentro de la vivienda.

No se encontró relación estadísticamente significativa entre la presencia de animales dentro de la casa y la seropositividad ($p = 0.6408$). La literatura ha documentado esta relación debido a que animales como perros, gatos, ratas y ratones son reservorios del parásito. Aunque el vector se alimenta de aves, estas no son consideradas reservorios del agente causal por no ser susceptibles a la infección por *T. cruzi*, debido a la existencia de un factor plásmico que lisa al tripanosoma y consecuentemente no puede retornar al ciclo por esa vía, aunque puede existir una relación por ser una fuente alimentaria del vector y la presencia en la vivienda (79).

Para el diagnóstico de la infección congénita se han realizado diferentes protocolos para el seguimiento de los hijos de madres positivas dependiendo del país, en los cuales para asegurar el diagnóstico en el recién nacido es indispensable la detección del parásito por método de microhematocrito o PCR. En esta investigación a todo caso positivo se solicitó una muestra sérica de madre e hijo para confirmación y una muestra de sangre completa del hijo la que fue recolectada en tubo con anticoagulante para realizar la prueba de microhematocrito. Sin embargo en todos los casos esta prueba fue negativa. Este resultado puede variar según la etapa de la enfermedad en que se encuentra la madre durante el embarazo, siendo la etapa aguda donde existe una mayor probabilidad de transmisión de madre a hijo (80-84).

Otra alternativa para la confirmación de infección congénita, es el seguimiento del hijo de madre chagásica por métodos serológicos determinando anticuerpos tipo IgG. Este seguimiento se debe realizar durante el primer año de vida cuando los anticuerpos maternos desaparecen de la circulación sanguínea del hijo, lo cual ocurre entre los 6 y 12 meses de vida, siendo el tiempo promedio en el octavo mes. Por ello, se realizó un seguimiento evaluando la evolución serológica durante 9 meses, obteniendo una

muestra del hijo al momento de la confirmación sérica para determinar el valor de anticuerpos basal, obteniéndose un resultado positivo en todos los niños. En el primer control del seguimiento realizado a los 3 meses, 6 niños presentaron un resultado negativo, evidenciando la eliminación de los anticuerpos maternos y un diagnóstico negativo de infección congénita debido a que el sistema inmunológico del niño aún no ha producido anticuerpos contra el parásito. Dos niños presentaron un resultado positivo con una disminución respecto a la basal, sin embargo no se obtuvo muestra para el segundo control a los 6 meses. Durante el segundo control realizado a los 6 meses, 2 niños presentaron un resultado negativo igual que en el primer control y 1 niño que no participó en el primer control presentó un resultado negativo.

Según los protocolos para el diagnóstico de transmisión congénita, durante el seguimiento parasitológico y/o serológico se debe tener un resultado positivo aún entre los 8 a 9 meses de vida, si el resultado es negativo se descarta la enfermedad de Chagas en el hijo de madre positiva. La aplicación de métodos serológicos para el seguimiento se debe a que los métodos parasitológicos convencionales son muy difíciles de implementar a nivel de salud pública y la determinación de anticuerpos IgG permite la detección de niños infectados congénitamente después de los 8 meses de edad, sin embargo, uno de los inconvenientes de este seguimiento para descartar la transmisión congénita es la inasistencia a los controles serológicos lo cual se evidenció en la investigación.

Es importante indicar que la transmisión vertical no se puede prevenir pero al realizar la detección y el tratamiento temprano de la infección congénita, el niño menor de un año obtiene un 100% de curación y durante el seguimiento serológico el paciente negativiza en un año posterior al tratamiento (84).

El diagnóstico tardío y los nacimientos en centros sin experiencia en el manejo de estos casos aumentan el riesgo potencial de infección congénita y la evolución a etapa crónica. El riesgo de transmisión vertical disminuiría al implementar un programa de tamizaje neonatal aplicando el ensayo inmunoenzimático adaptado en el área endémica, además este ensayo puede ser aplicado en muestreos en diferentes poblaciones en riesgo por las ventajas de transporte y almacenamiento de muestras, así como ser de bajo costo.

IX. CONCLUSIONES

1. Se realizó la adaptación de los métodos comerciales ELISA Omega Pathozyme[®] e ImmunoComb[®] II Chagas Ab para ser utilizado con muestra de sangre recolectada en papel filtro en el tamizaje neonatal de la Enfermedad de Chagas.
2. No se encontró evidencia de infección congénita en el plan piloto de tamizaje en los departamentos de Jutiapa, Zacapa, Santa Rosa y Jalapa.
3. La frecuencia de madres con anticuerpos contra *T. cruzi* fue de 2.86 %.
4. No se obtuvo una relación estadísticamente significativa ($p > 0.05$) al evaluar la seropositividad y los factores de riesgo asociados (manifestaciones clínicas de infección congénita, vía de transmisión y condiciones de la vivienda) excepto con la transfusión sanguínea en las madres ($p = 0.0424$).
5. La prueba de tamizaje adaptada en este estudio (ELISA Omega Pathozyme[®]) presenta una sensibilidad aceptable (90.00%) para un método de tamizaje neonatal de la enfermedad Chagas, siendo un método confirmatorio por su alta especificidad (100.00%).

X. RECOMENDACIONES

1. Implementar un método de diagnóstico serológico utilizando antígeno recombinante con las cepas de *T. cruzi* circulantes en el país para el diagnóstico de infección congénita de la enfermedad de Chagas.
2. Realizar estudios de la prevalencia de anticuerpos contra *T. cruzi* en mujeres embarazadas en el área endémica.
3. Evaluar los métodos inmunoenzimáticos adaptados con sueros positivos a *Leishmania* sp. para investigar reacción cruzada.

XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Mansilla M, *et al.* Chagas congénito. Presentación de una caso clínico y revisión bibliográfica. Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá 1999; 18
2. Mollinedo S, *et al.* Chagas Congénito en Bolivia Revista Médica - Órgano Oficial del Colegio Médico de La Paz - Vol. 11 N° 2 Mayo - Agosto 2005
3. Rodríguez E. Tripanosomiasis Americana: Aspectos teóricos. Curso Latinoamericano sobre Enfermedades infecciosas, Instituto de Biomedicina, UCV, Caracas, Venezuela, Octubre-Noviembre 2004, pp27.
4. Pérez G. Estudio sobre la inmunidad al agente de la enfermedad de Chagas en regiones escondidas de Guatemala, Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1980, Guatemala. USAC. pp. 48.
5. Morales E. Estudio clínico serológico de la enfermedad de Chagas en donadores de Banco de Sangre. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1992.
6. Andrino J. Determinación de anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en los trabajadores de los centros de salud de la región Ch'ortí del departamento de Chiquimula. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). Mayo 2008 Guatemala. USAC. p. 45
7. Salvatella R. *T. infestans* (Klug, 1834). Hemiptera, Triatominae) y su actual área de dispersión en el Uruguay. Bol Soc Zool Uruguay, 1991, Vol. 2, No. 6 pp 1-7.
8. Salvatella R. Chagasic endemia in Uruguay: control activities and its perspectives. An overview. In: Aspectos sociales, económicos y epidemiológicos de las nuevas herramientas para el control de la Enfermedad de Chagas. Santiago del Estero: TDWOMS, 1988: 106-20.
9. McConville M, *et al.* Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. Microbiol. Mol. Biol. Rev. Vol. 66. No. 1. Marzo 2002. pp 122-154.
10. Palau M. Relación hospedero-parásito *Trypanosoma cruzi* INS Grupo de Parasitología Bogotá, DC. Colombia Mvz-Cordoba 2000; 5:(1), 33-37

11. Cremona M, *et al.* Effect of primary structure modifications in *Trypanosoma cruzi* neuraminidasa/ transsialidase activities. *Cell Mol Biol* Vol. 5 No. 42, 1996, pp. 697-702.
12. Laucella S, *et al.* Soluble cell adhesion molecules in human Chagas disease: association with disease severity stage of infection. *Am J Trop Med Hyg.* Vol.6 No. 55. Año 1996 pp. 29-634.
13. McConville M, *et al.* Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Vol. 66, No. 1, Marzo 2002, pp112-154
14. Orozco M. Situación de los Principales Eventos de Vigilancia Epidemiológica, Enfermedad de Chagas, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social MSPAS, Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Centro Nacional de Epidemiología CNE. Guatemala, Año IX, No. 473 febrero 2007.
15. Dorn P, *et al.* The Chagas Vector, *Triatoma dimidiata* (Hemiptera:Reduviidae), is Panmictic within and Among Adjacent Villages in Guatemala. *J Med Entomol.* Vol 40. No. 4, July 2003 pp 436-440
16. Monroy C, *et al.* Epidemiology of Chagas Disease in Guatemala: Infection Rate of *Triatoma dimidiata*, *Triatoma nitida* and *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae) with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 98(3): 305-310, April 2003
17. JICA, Chagas Disease Vector Control Project Republic of Guatemala, 2000-2002
18. Komori K, *et al.* La situación de la enfermedad de Chagas en el departamento de Chiquimula. Guatemala. Agencia de cooperación Internacional de Japón (JICA). Enfermedades Transmitidas por Vectores (ETV). Área de Salud de Chiquimula. 2007 pp. 11-13.
19. Mazariegos L. Prevalencia de enfermedad de Chagas en donadores de Banco de Sangre. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 1986.
20. Blejer J, *et al.* Riesgo de transmisión de infecciones por vía transfusional. *Rev. Med.* Vol. 62, No. 3, 62: 259-278. 2002.

21. Curso Virtual de capacitación médica en el diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad de chagas. Organización Panamericana de la Salud, Médicos Sin Fronteras,
22. Llop A, *et al.* Microbiología y Parasitología Médica. Editorial Ciencias Médicas. 2001, Habana, Cuba. pp. 50-65.
23. Rivas M. Detección de anticuerpos a *T. cruzi* en madres y sus neonatos del Hospital Nacional de Chiquimula. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) Julio 1994, Guatemala, USAC. Pp
24. Villagran C, *et al.* Congenital Chagas disease: correlations between clinical manifestations and serological reactivities to *T. cruzi* peptides and laminin. Stockholm, Sweden, 1992. pag 28-29.
25. Ramos C, *et al.* Práctica Médica Efectiva, Enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). México. Vol. 4, No. 5, Mayo 2002. pp. 4
26. Pinto J. Historia Natural. En: Cardiopatía Chagásica. Editado por: J. Romeu Cancado y M. Chuster. Fundación Carlos Chagas. Belo Horizonte, MG, Brasil 1985; 99–113.
27. Blanco S, *et al.*, El Control de la transmisión congénita de *T. cruzi* en la Argentina. Medicina. Vol. 59. Supl II, 1999
28. Ponce R, *et al.* Estudio del Sistema Nervioso Autónomo Cardiovascular en la Enfermedad de Chagas en etapa crónica indeterminada. Arch. Med Int 1996; XVIII, 3: 103–107.
29. Koberle F. Die chronische Chagas Kardiopathie. Virchows Arch (pathol Anat) 1957; 330: 267-295.
30. Chapadeiro, *et al.* Incidencia de “megas” asociadas a cardiopatía chagásica. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. 1964.
31. Howard JE. La enfermedad de Chagas congénita. Santiago: Ed Standler. Universidad de Chile. Colección monografías biológicas 16. 1982
32. Moya P, *et al.* Enfermedad de Chagas congénita. Clínica y terapéutica de Enfermedad de Chagas. Rev. Ed. Fiocruz. 1997. Argentina
33. Moya P. Enfermedad de Chagas en la infancia. La Enfermedad de Chagas y el Sistema Nervioso. OPS. Publicación Científica. N° 547. 1994

34. Muñoz P, *et al.* Enfermedad de Chagas congénita sintomática en recién nacidos y lactantes. Rev. Chil. Pediatr. 1992. Vol. 63 (4), 196-202.
35. Freilij H, *et al.* Perinatal HIV Infection and Congenital Chagas disease. Ped. Inf. Dis. 1995. Vol.14, 161-162.
36. Moya P, *et al.* Enfermedad de Chagas congénita: Aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Experiencia de 30 años de seguimiento. Rev. Fac Cienc Med Córdoba. 1998
37. Freilij H, *et al.* Direct micromethod for diagnosis of acute and congenital chagas' disease. J Clin Microbiol. 1983. Vol. 18, 327. Argentina
38. Vega S, *et al.* Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis Americana (Enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud. Perú. 2006.
39. Azogue E, *et al.* Chagas Congénito en Bolivia: estudio comparativo de la eficacia y el costo de los métodos de diagnóstico. Rev. Da Soc. Bras. Med. Trop. 1995.Vol. 28(1), 39-43.
40. Mora M, *et al.* Aporte de las técnicas de biología molecular al diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. 1998
41. Reyes M, *et al.* Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Rev. Pro. Natl. Acad. Sci. 1990.Vol 87, 2846-2850.
42. Breniere S, *et al.* Transmisión transplacentaire de antibodys anti-*Trypanosoma cruzi*, Cah. ORSTOM, Ser., Ent. Méd. Et Parasitol. vol. 21(3), 139-140.
43. Stoppani A. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. Centro de Investigaciones Bioenergeticas. Facultad de Medicina. 1999. Argentina. p 147-165
44. Docampo R. Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Drugs. Rev. Chem.-Biol.Int. 1990. vol. 73,1-27.
45. Urbina J. Biología del *Trypanosoma cruzi* y Leishmania: Potencial para intervención quimioterapéutica. Instituto Venezolano de Investigaciones científicas. Venezuela. Septiembre 2006.
46. Urbina J, *et al.* Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Rev. Trends in Parasitology. 2003. Vol. 19(11), 495-501. Venezuela.
47. Reporte sobre la enfermedad de Chagas. Organización Mundial de la Salud. Buenos Aires Argentina. Julio 2007

48. Sosa S, *et al.* Tratamiento de la infección por *Trypanosoma cruzi* en fase indeterminada. Experiencia y normatización actual en la Argentina. Rev. Med. 1999.vol. 59(2), p166-170.
49. Dirección General de Planificación y Evaluación, Departamento de salud pública, Generalitat de Catalunya. Protocolo de cribado y diagnóstico de la enfermedad de Chagas en mujeres embarazadas latinoamericanas y sus bebés. Primera edición 27 de enero de 2010, Barcelona, España.
50. Altcheh J, *et al.* Anticuerpos Anti-F2/3 como marcador de curación en niños con infección congénita por *Trypanosoma cruzi*. Rev. Méd.2003. vol. 63 No. 1. Buenos Aires.
51. Barba J. Tamiz neonatal: Una estrategia en la medicina preventiva. Rev. Mex. Pat. Clin. 2004. Vol 51 No. 3. p 16. México.
52. Holland W, *et al.* Policy Brief, Screening in Europe. World Health Organization (WHO). 2006.
53. Camargo E, *et al.* Newborn Screening for Congenital Infectious Diseases. Emerging Infectious Diseases. Vol. 10, No. 6, June 2004. pp. 5
54. Palacios, *et al.* Detección de anticuerpos contra *T. cruzi* mediante ELISA indirecto. Rev. Pan Am J Public Health 8(6), 2000
55. Oliva M. Frecuencia de hipotiroidismo congénito en Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). Noviembre 2004.
56. Vela M, *et al.* Tamiz neonatal del hipotiroidismo congénito en México, frecuencia en los últimos diez años. Acta pediátrica de México, 2000. Vol- 21, Núm 4.
57. Serrano C., Determinación de la frecuencia de fenilcetonuria, galactosemia e hipotiroidismo congénito, en personas con retraso mental que asisten a dos Centros de Cuidado Especial en la Ciudad de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia). 2006
58. Fernández A. *et al.* Estabilidad de HBSAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro. Bioquímica. Diciembre Año 2002 Vol. 27, No. 004. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, A.C. pp. 103-106

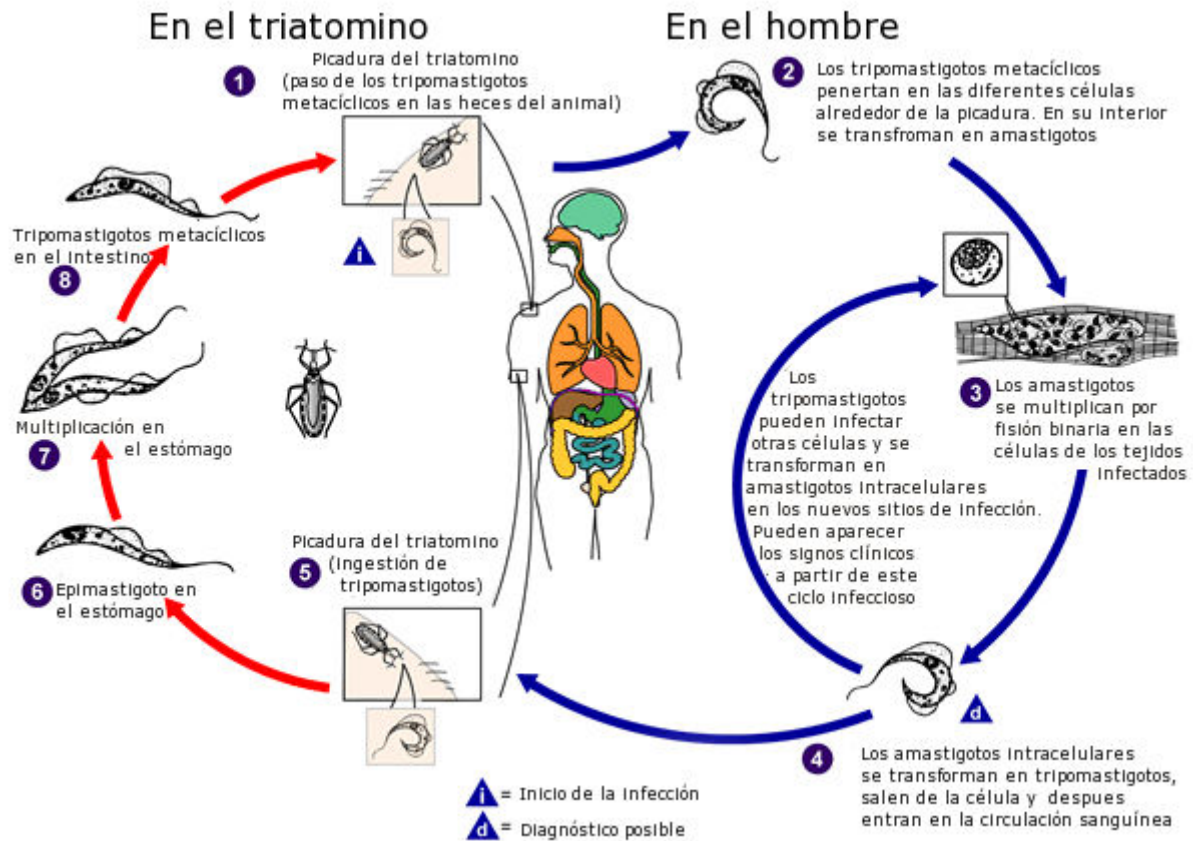
59. Vela M, *et al.* Técnica de toma de sangre del cordón umbilical para tamiz neonatal. *Acta Pediatr. Méx.* No. 21. 2000.
60. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and Association of Public Health Laboratories. Newborn Screening Quality Assurance Program, Volume 22, Marzo 2005.
61. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). External Quality Assurance for HIV Rapid Tests Using Dried Blood Spots, 2007.
62. Whatman. Whatman Neonatal Screening Cards, Capabilities.2008
63. Universidad de Oviedo, España. Grupo de respuesta celular al estrés oxidativo. Estrés oxidativo. Fecha de última actualización: Noviembre 2003, Disponible en: web.uniovi.es/estresoxidativo/protocolos/Western.pdf.
64. Cruz, C. Estandarización de la prueba de Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus *Phlebotomus fever*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú. (Tesis de graduación, Facultad de Farmacia y Bioquímica), 2001.
65. Gibbs J. Effective Bloqking Procedures. ELISA Technical Bulletin No.3. Corning Incorporated. July, 2001.
66. Parker S, *et al.* The use of the dried blood spot simple in epidemiological studies. *J Clin Pathol* 1999; 52:633-639.
67. Delahanty-Fernandez, *et al.* Detección de HBsAg en muestras de sangre seca sobre papel filtro empleando el UMELISA HBsAg PLUs. *Rev Biomed* 2003; 14:17-21. Vol. 14/No.1/Enero-Marzo, 2003
68. Vasquez S. *et al.* Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel filtro. *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 3(3), 1998
69. García M, *et al.* Determinación de anticuerpos IgM contra el virus dengue a partir de sangre absorbida en papel filtro: un método alternativo y sencillo. *Rev Med Exp* 2000; 17 (1-4)
70. Zicker F. *et al.* Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. *Bulletin of the World Health Organization*, 68 (4): 465-471 (1990)

71. Grijalva M, *et al.* Seroprevalence and risk factors for *Trypanosoma cruzi* infection in the amazon region of Ecuador. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 69(4), 2003, pp. 380-385
72. Borges J, *et al.* Seroprevalence of Chagas disease in schoolchildren from two municipalities of Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil. Six years following the onset of epidemiological surveillance. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.* 48 (2): 81-86, March-April, 2006
73. Rodríguez L, *et al.* Toma de muestra en papel filtro para la detección de anticuerpos IgM antiviral de la hepatitis A. Instituto de medicina tropical "Pedro Kouri" *Rev. Cubana Med Trop.* 1998; 50(1): 42-7
74. Vásquez S, *et al.* Utilidad de sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de inhibición. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 33 (4): 309-311, julio-agosto, 1991.
75. Esser P, *et al.* Blocking Agent and Detergent in ELISA. Technical Bulletin: No.9. 2010
76. Gomori, G., Preparation of Buffers for Use in Enzyme Studies. *Methods Enzymology*, 1, 138-146, 1955.
77. Secretaría de planificación y programación de la presidencia (SEGEPLAN). Análisis territorial, índice de pobreza general y extrema pobreza. 2009.
78. Congreso de la República de Guatemala. Decreto 87-97. Ley de servicios de medicina transfusional y bancos de Sangre.
79. Sanmartino M, *et al.* Conocimientos sobre la enfermedad de Chagas y factores de riesgo en comunidades epidemiológicamente diferentes de Argentina *Rev. Panam Salud Publica/Pan Am J Public Health* 7(3), 2000
80. Blanco S, *et al.* El control de la transmisión congénita de *Trypanosoma cruzi* en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 59 (Supl. II): 138-142. 1999
81. Moretti E. Fortalecimiento en la Enseñanza de la Enfermedad de Chagas. Diagnóstico de Laboratorio II. Estudios inmunoserológicos. Coordinación Nacional de Control de Vectores, Córdoba, Argentina. 2009
82. Zaidenberg M. La enfermedad de Chagas congénita en la Provincia de Salta, Argentina, años 1980-1997. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* 32(6): 689-695, nov-dez, 1999.

83. Moya P, *et al.* Enfermedad de Chagas congénita: Aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos y terapéuticos. Estado actual y perspectivas. Abril 2010.
84. Unidad de Patología infecciosa e inmunodeficiencias de Pediatría. HUVH. Protocolo de seguimiento del RN de madre con serología positiva para *Trypanosoma cruzi* (Enfermedad de Chagas). Barcelona. Diciembre 2010.

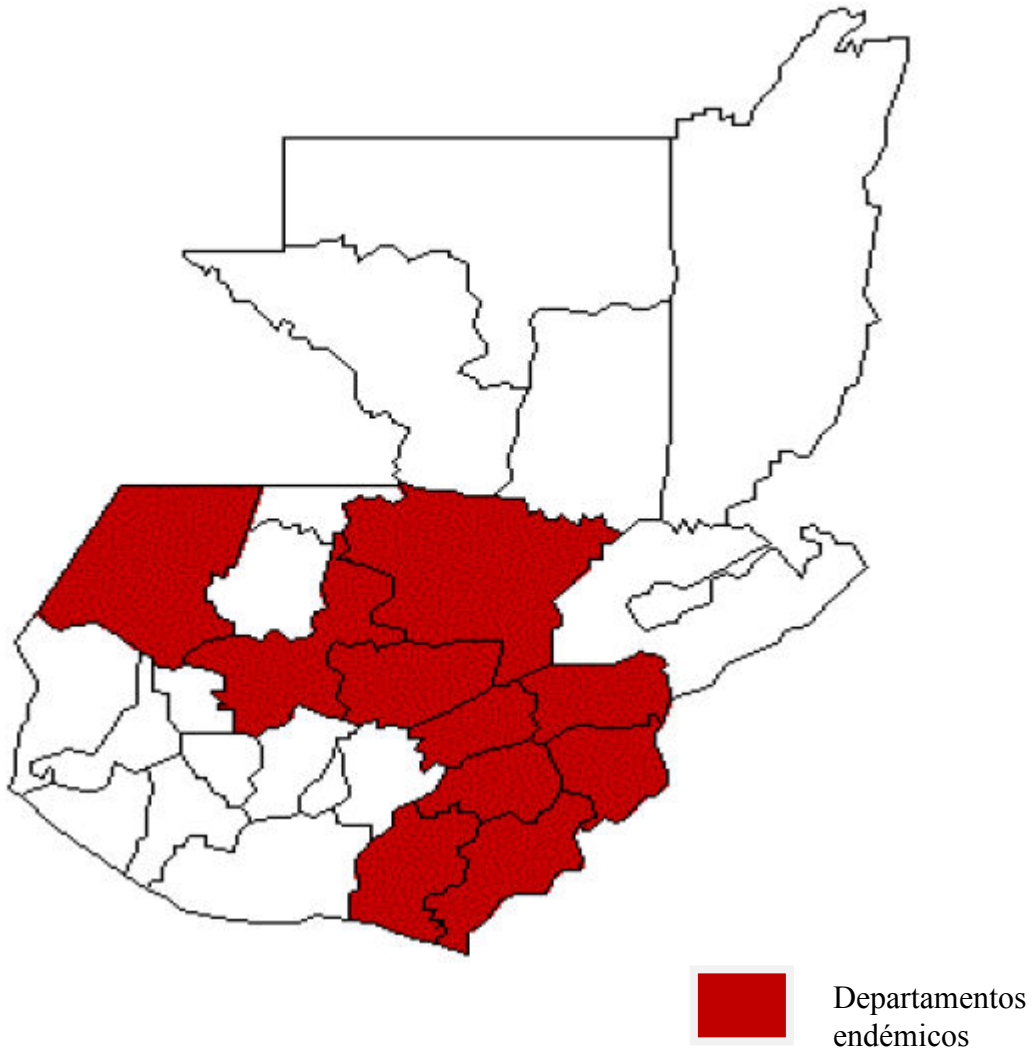
XII. ANEXOS

Anexo 1.- Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*.



Fuente: Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, Trypanosomiasis American. Página de internet visitada: <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm>. Última fecha actualización: 17/06/08.

Anexo 2.- Áreas Chagásicas prioritarias de Guatemala



Fuente: Orozco M. Situación de los Principales Eventos de Vigilancia Epidemiológica, Enfermedad de Chagas, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social MSPAS, Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Centro Nacional de Epidemiología CNE. Guatemala, Año IX, No. 473 febrero 2007.

Anexo 3.- Utilidad de las técnicas de diagnóstico en las formas clínicas

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO	FORMAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD		
	AGUDA	CRÓNICA-PORTADOR	CONGÉNITA
GOTA FRESCA	+	-	+
GOTA GRUESA	++	-	++
MICROCONCENTRACION	+++	-	+++
CONCENTRACION DE STROUT	+++	-	+++
HEMOCULTIVO	+++	+/-	+++
XENODIAGNOSTICO	+++	+	+++
PCR	++++	++	++++
PRUEBAS SEROLOGICAS (HAI, ELISA, IFI)	- Al inicio +++ después de 20 días	+++	IgG +: Ac de la madre IgM +: Ac del recién nacido hasta los seis meses

- : No útil

+/-: Utilidad relativa

+: Útil

Ac: Anticuerpos

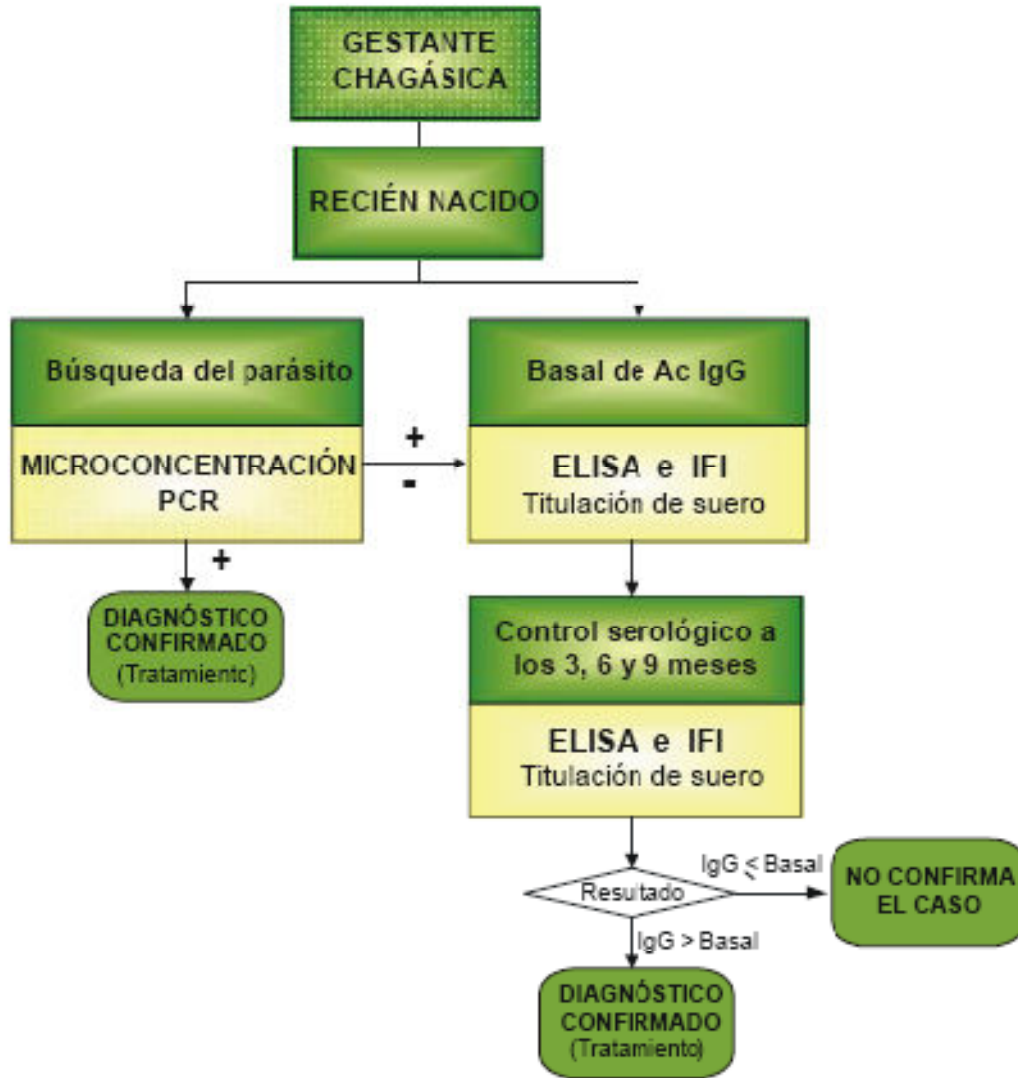
Fuente: Vega S. *et al.* Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis Americana (Enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud. 2006. Perú. 25

Anexo 4.- Clasificación de métodos diagnósticos para la enfermedad de Chagas.

MÉTODOS DIRECTOS	MÉTODOS INDIRECTOS
<ul style="list-style-type: none">▪ Examen en fresco▪ Gota gruesa▪ Método de concentración de Strout▪ Triple centrifugación▪ Microhematocrito	<ul style="list-style-type: none">▪ Hemocultivo▪ Xenodiagnóstico▪ Inmunodiagnóstico:<ul style="list-style-type: none">• Inmunofluorescencia indirecta (IFI)• Aglutinación directa (AD)• Hemoaglutinación indirecta (HAI)• Fijación de complemento (FdC)• ELISA

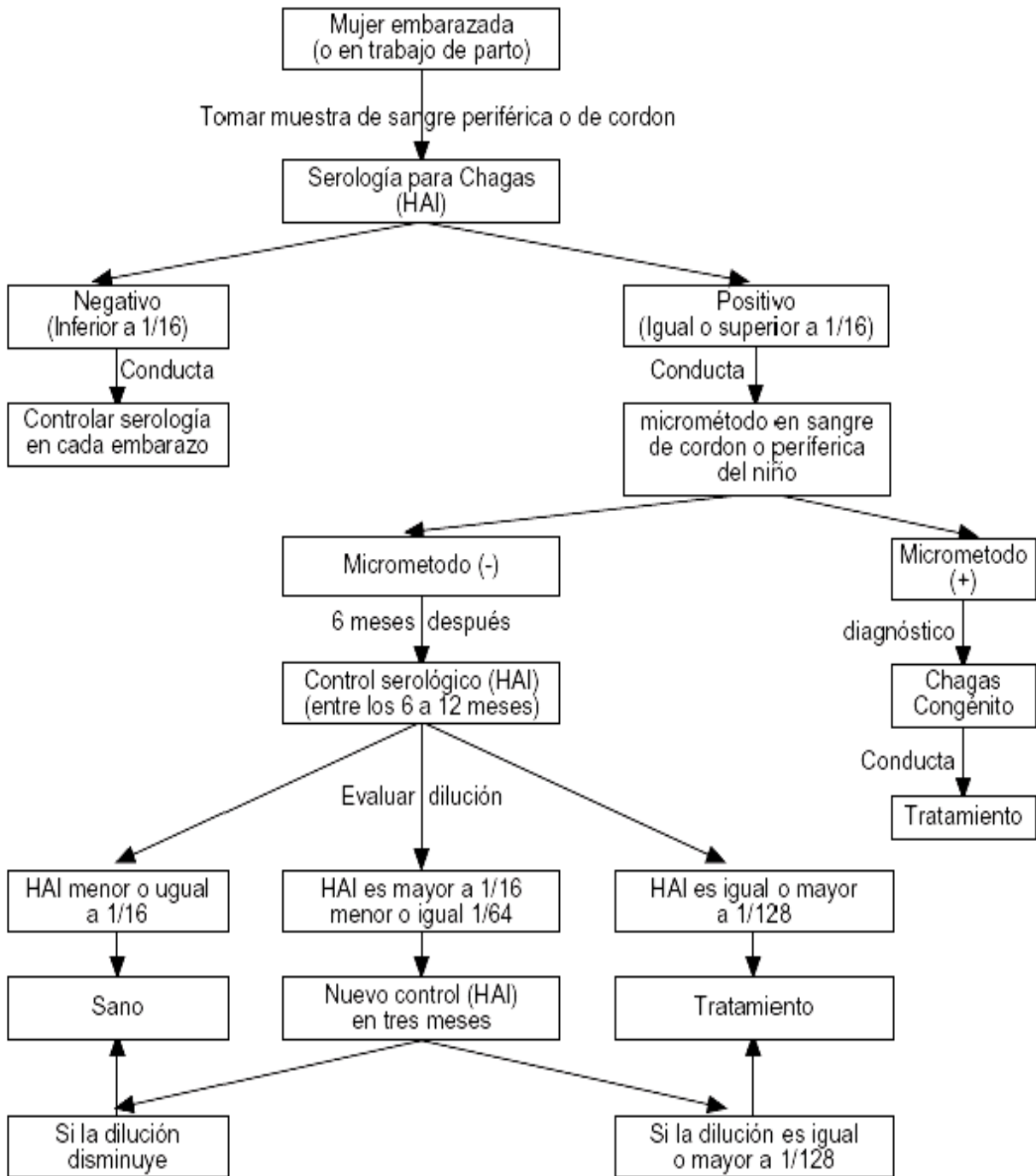
Fuente: Mansilla y col. Chagas congénito. Presentación de una caso clínico y revisión bibliográfica. Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá 1999; 18

Anexo 5.- Algoritmo para diagnóstico de la enfermedad de Chagas congénito.



Fuente: Vega S. *et al.* Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de la trypanosomiosis Americana (Enfermedad de Chagas). Ministerio de Salud. 2006. Perú. 25

Anexo 6.- Algoritmo para diagnóstico y tratamiento del Chagas congénito.



Fuente: Mansilla y col. Chagas congénito. Presentación de una caso clínico y revisión bibliográfica. Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá 1999; 18

Anexo 7. Soluciones de bloqueo comúnmente usadas

Agente bloqueante	Características
Leche descremada	5% de leche descremada en PBS. Muy económico. Se deteriora con rapidez. Es posible que tape algunos antígenos.
Leche descremada/ Tween-20	Económico. 5% de leche descremada en PBS/Tween-20. Se deteriora con rapidez. Es posible que tape algunos antígenos.
Tween-20	0.1% Tween-20, 0.02% azida sódica en PBS. Económico. Permite la tinción después de la inmunodetección.
BSA	3% BSA, 0,02% azida sódica en PBS. Bueno. Relativamente económico.
Suero de caballo	10% suero de caballo, 0,02% azida sódica en PBS. Moderadamente caro. Incompatible con algunos anticuerpos anti-inmunoglobulinas.

Fuente: Cruz, C. Estandarización de la prueba de Ensayo Inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus *Phlebotomus fever*. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Lima, Perú. (Tesis de graduación, Facultad de Farmacia y Bioquímica), 2001.

Anexo 8.- Preparación de amortiguadores de elución

i. Amortiguador fosfato salino:Tween (PBS-T)

Solución A (3L)		Solución B (1.0 L)	
0.1 M Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	80.4 gr.	0.1M NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	13.8 gr.
8.5% NaCl	255.0 gr.	8.5% NaCl	85.0 gr.
Agua destilada	3000 ml.	Agua destilada	1000 ml.

Adicionar la solución B a la solución A para dar un pH 7.2.

Adicionar 5 ml de Tween 20 por cada litro de 10mM PBS, filtrar y almacenar a temperatura ambiente.

ii. Amortiguador de gelatina

0.01 M EDTA	1.86 gr.
0.05M Amortiguador fosfato salino	50 ml.
0.1% NaN ₃	5 ml
0.1 % Gelatina	0.5 gr.

Aforar a 500 ml con agua destilada.

iii. Amortiguador de seroalbúmina bovina

0.05M Amortiguador fosfato salino	50 ml.
0.1% NaN ₃	5 ml. al 10%
0.01%EDTA	0.05 gr.
0.9% NaCl	4.5 gr.
1% seroalbúmina bovina	5gr.
Tween 20	1.25 ml al 10%

Aforar a 500 ml con agua destilada.

iv. Amortiguador de leche descremada

Amortiguador fosfato salino-0.05% Tween	500 ml.
Tween 20	1.25 ml.
Leche descremada	25 gr.

Mezclar por una hora.

Fuente: Therrell B. Laboratory Methods for Neonatal Screening. American Public Health Association, Washington, DC: 2005, pp 191-234

Anexo 9.- Carta de Consentimiento.



Universidad de San Carlos de Guatemala
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia
Escuela de Química Biológica.

HOJA DE CONSENTIMIENTO

Yo, _____ autorizo la utilización de la sangre de mi hijo(a) y sus componentes para la investigación sobre “TAMIZAJE NEONATAL DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EN LA REPÚBLICA DE GUATEMALA”, que será realizado por la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos. Entiendo que la participación es voluntaria y que los resultados obtenidos son de beneficio para la salud de mi hijo(a), además comprendo que la toma de muestra de sangre no representa ningún riesgo físico para mi hijo(a).

Firma _____

Anexo 10.- Ficha de datos para la recolección muestras de sangre

Anverso

No. Registro _____

Parto: Normal Cesárea

Sexo: Femenino Masculino

Hijo de: _____

Dirección: _____

Teléfono: _____

Fecha nacimiento ____/____/20__

Fecha toma de muestra ____/____/20__

Semanas de embarazo _____

Peso al nacer: _____ libras _____ onzas.

Gemelo 1 2

Reverso

Número total de embarazos _____

partos _____ abortos _____ mortinatos _____

¿Ha recibido transfusiones de sangre?

Si No ¿Cuándo? _____

¿Conoce la chinche picuda? Si No

¿Ha observado la chinche picuda dentro de su casa? Si No

¿De qué material son las paredes de su casa?

Bajareque adobe madera




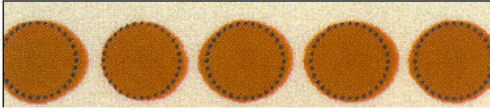

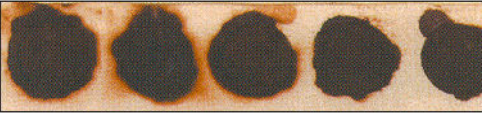
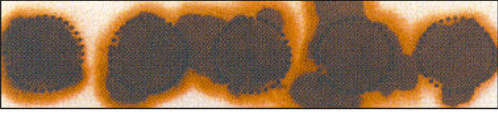


Lámina otros

¿Qué material tiene el piso? Tierra piso

cemento

¿Posee animales dentro de su casa? Si No

Anexo 11.- Evaluación de las muestras

Muestra válida	Características
	<p>Dejar una cantidad suficiente de sangre para llenar completamente el círculo preimpreso en el filtro papel. Rellene todos los requerimientos de los círculos de sangre. No colocar capas sucesivas de sangre. Evitar tocar el área de las muestras.</p>
Muestra inválida	Causa probable
	<p>Cantidad insuficiente para la prueba. Retirar el papel filtro antes de llenar por completo el círculo de sangre. Aplicación de la sangre al papel de filtro con un tubo capilar. Contacto del papel de filtro antes o después de la toma de muestra.</p>
	<p>Muestra lastimada debido a la aplicación de la sangre en el papel filtro con un tubo capilar u otro dispositivo.</p>
	<p>Muestras almacenadas y enviadas antes de su secado completo</p>
	<p>Muestras en papel filtro saturadas. Exceso de aplicación de sangre en el papel de filtro, por lo general con un dispositivo. Aplicación de sangre en ambos lados del papel de filtro.</p>
	<p>Muestra diluida, decoloradas o contaminados. Contacto del papel filtro con manos o sustancias como el alcohol, soluciones antisépticas, agua, loción, etc, ya sea antes o después de la recolección muestras. Exposición de la muestras de sangre a cualquier fuente de calor.</p>
	<p>Muestra con anillo de suero Contacto del papel filtro con alcohol, loción de manos, etc. Presión sobre el sitio de punción, secado de muestra incorrectamente. La aplicación de la sangre al papel de filtro con tubo capilar.</p>
	<p>Muestra coagulada. Tocar el mismo círculo de papel de filtro a gota de sangre en varias ocasiones. Llenado círculo a ambos lados del papel de filtro.</p>
	<p>Falló al tomar la muestra de sangr</p>

Washington State Department of Health, Newborn Screening Program, fecha de actualización: 11/20/2006.

Página de internet: <http://www.doh.wa.gov/ehsphi/PHL/Newborn/specqa2.htm>, Fecha de visitada 2 septiembre 2008.

Claudia Fabiola Estrada González
Seminarista

Jorge Alberto Rodas Cruz
Seminarista

Licda. Karla Josefina Lange
Asesora

MSc. Vivian Lucrecia Matta de García
Asesora

M.A. Ana Margarita Paz
Revisora

M.A. Maria Eugenia Paredes
Directora de Escuela

Oscar Cobar Pinto, Ph. D.
Decano